

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Vodičková

STANOVENÍ PROTEINŮ –
VLIV SLOŽENÍ PROTEINU, MOŽNOST POUŽITÍ
SPEKTROFOTOMETRU PRO MALÉ OBJEMY

Protein determination – Effect of protein composition, application
of small volume spectrophotometer

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2013.

Abstrakt

V posledních letech se na trhu objevily spektrometry pro měření malých objemů v řádu mikrolitrů. Jejich hlavní aplikační oblastí je stanovení proteinů, resp. proteinů a nukleových kyselin vedle sebe přímou spektrofotometrií, popř. dalšími spektrálními metodami. Jedním z takových přístrojů je i spektrofotometr NanoVue™ Plus (GE Healthcare). V práci byla nejprve ověřována použitelnost tohoto přístroje (stabilita) a optimalizovány podmínky měření (objem vzorku). Pro stanovení proteinů přímou spektrofotometrií byly využity přednastavené programy na tomto přístroji, data byla ověřena nezávislým výpočtem. Dále bylo studováno ovlivnění naměřených hodnot rozdíly ve složení různých proteinů. Jak ukazují výsledky této diplomové práce, nejsprávnějších výsledků se dosahuje s použitím přednastaveného programu E 1%, když se potřebná hodnota E 1% zjistí experimentálně. Naopak použití programu Protein UV poskytuje výsledky často výrazně odlišné od správných hodnot a projevuje se zde vysoká závislost na složení proteinu.

Klíčová slova: stanovení proteinů, spektrofotometr NanoVue™ Plus, vliv aminokyselinového složení proteinu

Abstract

Recently, several spectrometers for small volume measurements in order of microliter have been introduced. They are primarily intended for protein determination (or determination of proteins and nucleic acids in one measurement) by direct spectrophotometry or other spectral methods. One of such instruments is the NanoVueTM Plus (GE Healthcare). In this work, we first tried to characterize the instrument in general terms (stability) and to optimize measurement conditions (sample volume). Proteins have been determined by direct spectrophotometry using internal programs of the instrument, data were controlled by an independent computation. We studied also influence of differences in composition of various proteins on the results. According to the results of this Thesis, the most accurate values could be obtained using the internal program E 1%, using the E 1% value from an experiment. On the other hand, the program Protein UV is producing often inaccurate values, strongly influenced by the protein amino acid composition.

Keywords: protein determination, spectrophotometer NanoVueTM Plus, influence of amino acid composition

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za odborné vedení, ochotu a pomoc při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře 222 za milé přijetí a pomoc.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	8
Úvod	10
1 Přehled literatury	11
1.1 Stanovení proteinů	11
1.1.1 Sérový albumin	12
1.2 Spektrometrické metody	14
1.2.1 Přímé spektrometrické stanovení proteinů	15
1.2.2 Metody založené na vzniku barevného produktu	19
1.2.3 Metody založené na vzniku komplexu barvivo – protein	21
1.3 Spektrofotometry pro měření malých objemů vzorků	22
1.3.1 Spektrofotometr NanoVue™ Plus	23
2 Experimentální část	26
2.1 Použité chemikálie a přístroje	26
2.2 Příprava zásobních roztoků	26
2.3 Postup práce	27
2.3.1 Měření a zpracování získaných dat	27
2.3.2 Vliv velikosti nanášeného objemu	27
2.3.3 Roztoky hovězího sérového albuminu	28
2.3.4 Měření dalších roztoků proteinů	29
2.3.5 Měření spektra proteinů	29
2.3.6 Stanovení hmotnostního extinkčního koeficientu	30
2.3.7 Stanovení extinkčního koeficientu E1%	30
2.3.8 Stabilita hodnoty absorbance v čase	30
2.3.9 Sušení proteinů – zjištění množství obsažené vody v proteinu	31
3 Výsledky a diskuze	32

3.1	Technické parametry	32
3.1.1	Určení vhodného objemu nanášeného vzorku	32
3.1.2	Změny hodnoty absorbance v čase	34
3.1.3	Odhad přesnosti měření při použití spektrofotometru NanoVue™ Plus	35
3.2	Porovnání spekter lysozymu a BSA získaných na různých spektrofotometrech	36
3.3	Stanovení proteinů	40
3.3.1	Stanovení extinčních koeficientů	40
3.3.2	Měření koncentrace BSA zvolenými programy – „ověření použitelnosti“	40
3.3.3	Zjištění obsahu vody v lyofilizovaném vzorku proteinu	45
3.3.4	Vliv složení proteinu při měření koncentrace programem E1%	46
3.3.5	Vliv složení proteinu při měření koncentrace programem Protein UV	48
3.4	Ověření výpočty	50
3.4.1	Srovnání vypočtených hodnot molárního absorpčního koeficientu	50
3.4.2	Význam číselných koeficientů pro stanovení proteinů dle „Christiana-Warburga“	50
3.4.3	Vliv složení proteinů na hodnotu „celkové koncentrace“	51
4	Závěr	54
5	Seznam citované literatury	55

Seznam zkratek a symbolů

A – absorbance

\tilde{A} – mediánová hodnota absorbance

A_{BSA} – absorbance hovězího sérového albuminu

A_L – absorbance lysozymu

c – koncentrace

c_p – koncentrace proteinu (mg/ml)

c_{PU} – zdánlivá koncentrace proteinu v pufru (mg/ml)

c_{DV} – zdánlivá koncentrace proteinu v destilované vodě (mg/ml)

c_T – koncentrace proteinu (teoretická, získaná z navážky) (mg/ml)

c_{BK} – koncentrace proteinu, získaná experimentálně bez použití korekce pozadí (mg/ml)

c_V – koncentrace proteinu vypočtená s pomocí korekce na obsah vody (mg/ml)

l – optická dráha, délka absorbujícího prostředí (cm, mm)

ϵ – absorpční koeficient (molární), extinční koeficient (mol/g.cm)

λ – vlnová délka (nm)

BSA – hovězí sérový albumin

HSA – lidský sérový albumin

CBB – Coomassie Brilliant Blue

SDS – dodecylsírán sodný

BCA – bicinchoninová kyselina

pK_A – záporný dekadický logaritmus konstanty kyseliny

BPB – bromfenolová modř

Tris – tris(hydroxymethyl)aminometan

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

VSD – výběrová směrodatná odchylka (mg/ml)

Phe – fenylalanin

Trp – tryptofan

Tyr – tyrosin

Cys – cystein

X_{Trp} – počet tryptofanových zbytků v molekule

X_{Tyr} – počet tyrosinových zbytků v molekule

X_{Cys} – počet cysteinových zbytků v molekule

w/v % - hmotnostně-objemová procenta

w/w % - hmotnostní procenta

E 1% - extinkční koeficient 1 % roztoku (w/w); název programu na přístroji NanoVue™

Plus

E_{ma} – hmotnostní extinkční koeficient roztoku 1 mg/ml (mass extinction coefficient)

Úvod

V klinických a biochemických laboratořích patří stanovení proteinů v různých tělních tekutinách k nejčastěji prováděným operacím, protože tento parametr je vhodným ukazatelem při zjištění správné funkce organismu nebo funkce jednotlivých orgánů.

Ve většině případů je v analyzovaném vzorku přítomen více než jeden protein. Mohou zde být zastoupeny proteiny s odlišnou strukturou, složením a vlastnostmi. Velmi často je důležitou hodnotou souhrnné zastoupení všech proteinů v daném vzorku. Stanovujeme-li tuto hodnotu, hovoříme o stanovení „celkového proteinu“. Pro toto stanovení nebo stanovení konkrétního proteinu můžeme použít různé metody. Nejčastěji jsou používány metody spektrofotometrické. Těmito metodami se dají stanovit i jednotlivé proteiny, pokud jsou vhodnou separací rozděleny před vlastním spektrofotometrickým měřením. Konkrétní proteiny se ovšem nejčastěji stanovují imunochemickými metodami, které jsou založeny na specifické vazbě mezi antigenem a protilátkou. V případě enzymů stanovujeme jejich aktivitu pomocí sledování přírůstku produktu v čase a to u těch reakcí, které daný enzym katalyzuje.

Ve své práci se zaměřím na spektrofotometrické metody stanovení proteinů a to především na stanovení prováděná v UV oblasti. Měření budou prováděna na spektrofotometru NanoVueTM Plus, který se na trhu objevil v posledních letech. Je určen pro měření v malých objemech (jednotky μl). Cílem bylo ověřit použitelnost tohoto přístroje, který je výrobcem doporučován právě pro stanovení proteinů, resp. proteinů a nukleových kyselin vedle sebe. Současně se však v různých webových diskusích objevují výhrady a kritické připomínky k dosahované reprodukovatelnosti měření na instrumentaci tohoto typu. Proto v této práci budou porovnávány dosažené výsledky získané pomocí několika, na přístroji již přednastavených, metod. Hodnoty získané na tomto přístroji budou dále porovnávány s hodnotami získanými na přístroji Hewlett-Packard 8453E.

1 Přehled literatury

1.1 Stanovení proteinů

Přítomnost proteinů nebo jejich koncentrace v tělních tekutinách slouží jako ukazatel správné funkce organismu nebo jednotlivých orgánů [1]. Například snížená koncentrace albuminu v séru může být způsobena onemocněním nebo poškozením jater či ledvin [2]. Naopak zvýšená hladina albuminu v moči nad hodnotu 25 mg/l může ukazovat na začínající poškození ledvin [2]. Při směsném stanovení všech proteinů přítomných ve vzorku hovoříme o stanovení tzv. „celkového proteinu“. Takové stanovení se nejčastěji provádí ze vzorků krevního séra nebo plazmy.

Jedním z kritérií, jak lze dělit metody stanovení „celkových proteinů“ je to, zda jde o metodu „absolutní“ nebo „relativní“. Absolutní metodou rozumíme takový postup, při kterém získáme přímo číselnou hodnotu měřené veličiny (celkové množství proteinů). Takovou metodou je gravimetrie, kdy se celkové proteiny stanovují zvážením odparku nebo sraženiny proteinů [3]. Metoda je použitelná jen pro čisté roztoky proteinů.

Další metody stanovení proteinů patří mezi relativní metody, kdy se pro stanovení koncentrace využívá porovnání se standardem. Tyto metody vždy více či méně závisejí na aminokyselinovém složení stanovovaného proteinu. Při použití standardu ale nesmíme zapomínat, že zastoupení jednotlivých proteinů, tedy i jednotlivých aminokyselin, v analyzovaném vzorku je odlišné od složení použitého standardu. Protože neexistuje žádný univerzální standard, musí být vždy uvedeno, jaký protein, popřípadě směs proteinů, byly jako standard použity. Nejčastěji se pro kalibraci využívá hovězí sérový albumin, lidský sérový albumin nebo směs albuminu s globulinem [4]. Albumin je pro tento účel oblíbený, protože je dominantním proteinem krevní plazmy [1]. Například v séru dospělého člověka je albumin přítomen v rozmezí 35-50 g/l [2]. Další výhodou je to, že je pro laboratorní účely dostupný ve vysoké čistotě a za přijatelnou cenu [5]. Je třeba si uvědomit, že aminokyselinové složení sérového albuminu je v některých aspektech dosti odlišné od průměrného složení proteinů (viz Tab. 1.1). Při stanovení proteinů pak může vzniknout chyba, která je způsobena odlišností standardu od stanovované bílkoviny. Protože v zásadě platí, že

ve směsi proteinů se jejich složení „průměruje“, zvyšuje se často odchylka stanovení při analýze roztoku obsahujícího pouze jeden protein, kdy se mohou výrazněji projevit individuální rozdíly [3].

1.1.1 Sérový albumin

Již bylo řečeno, hovězí a lidský sérový albumin patří mezi proteiny, které jsou velice často používané jako standard při stanovení proteinů [4]. Současně však jde o protein, jehož aminokyselinové složení se dosti výrazně liší od složení „průměrného proteinu“. Bohužel se tyto rozdíly v zastoupení jednotlivých aminokyselin týkají také aminokyselin, které se uplatňují jak v přímých tak na nepřímých metodách stanovení proteinů. Přehledně jsou tyto rozdíly shrnuty v tabulce 1.1.

Tab 1.1 Zastoupení některých významných aminokyselin v BSA, HSA a v „průměrném proteinu“, z práce [2]

Aminokyselina	BSA	HSA	„Průměrný protein“
Cys	35	35	19
Tyr	20	18	19
Phe	27	31	22
Trp	2	1	6

Další proteiny, které se mohou používat, jako standardy, jsou například α -laktalbumin, lysozym a vaječný albumin. Jejich složení (zastoupení významných aminokyselin) je uvedeno v tabulce 1.2.

Tab 1.2 Zastoupení některých aminokyselin v lysozymu, vaječném albuminu a v α -laktalbuminu, z prací [6, 7, 8, 9,10]

Aminokyselina	α -laktalbumin	Vaječný albumin	Lysozym
Cys	8	6	8
Tyr	4	10	3
Phe	4	20	3
Trp	4	3	6

Pro posouzení vhodnosti použití jednotlivých standardů je ale důležitější znát zastoupení různých aminokyselin, vztažené na hmotnost bílkoviny. Tyto hodnoty (získané přepočtem) jsou uvedeny v tabulce 1.3.

Tab 1.3 Procentuální zastoupení významných aminokyselin v BSA, HSA, α -laktalbuminu, lysozymu, vaječném albuminu a v „průměrném proteinu“

	Cys	Tyr	Phe	Trp
BSA	6,39	5,46	6,72	0,62
HSA	6,37	4,90	7,70	0,31
α -laktalbumin	6,82	5,10	4,65	5,75
Lysozym	6,78	3,79	3,46	8,55
Vaječný albumin	1,70	4,23	7,72	1,43
„průměrný protein“	3,25	3,25	3,76	1,03

Uvedené hodnoty jsou v g na 100 g proteinu a byly získány přepočtem z hodnot v tabulkách 1.1 a 1.2 za použití následujících hodnot relativních molekulových hmotností. (BSA 66411; HSA 66438; α -laktalbumin 14186; vaječný albumin 42756; lysozym 14314) [2,11]. Hodnoty pro průměrný protein byly spočteny z dat uvedených v práci [2].

1.2 Spektrometrické metody

Spektrometrické metody patří mezi metody optické, které jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s analyzovanou látkou.

Konkrétní dělení spektrometrických metod podle různých hledisek je možné nalézt v běžné literatuře [12, 13, 14, 15]. Jedním z hledisek dělení spektrometrických metod je to, zda při interakci mezi zkoumanou látkou a elektromagnetickým zářením dochází nebo nedochází k výměně energie. Mezi metody, při kterých k výměně energie nedochází, patří refraktometrie, polarimetrie nebo turbidimetrie. V opačném případě může docházet k absorpci nebo emisi záření.

Dalším hlediskem pro dělení spektrometrických metod je, zda jsou použity na studium atomů nebo molekul. Podle toho rozeznáváme metody atomové absorpční/emisní spektrometrie a molekulové absorpční/emisní spektrometrie. Dále lze dělit spektrometrické metody podle oblasti použitých vlnových délek záření. V tomto případě dělíme spektrometrii například na UV/VIS (ultrafialová a viditelná spektrometrie) nebo infračervenou spektrometrii.

V této práci se budu zabývat molekulovou absorpční spektrometrií v UV/VIS oblasti, kde dochází k absorpci záření o hodnotě vlnových délek v rozmezí 200 – 800 nm. Jako UV oblast se označuje rozmezí vlnových délek 200 – 380 nm. Podle hodnoty vlnové délky absorbovaného záření můžeme identifikovat zkoumanou látku, ale identifikace látky jen podle absorpčního spektra v UV/VIS oblasti není obvykle jednoznačná. Podle hodnoty absorbance pak můžeme stanovit koncentraci zkoumané látky [12,13].

Při využití spektrofotometrie pro kvantitativní analýzu se používá známý Lambert – Beerův zákon, který využívá vztahu mezi absorbancí, koncentrací analytu ve vzorku (c), který absorbuje monochromatické záření, a optickou dráhou paprsku v absorbujícím prostředí (l), za kterou obvykle dosazujeme délku kyvety:

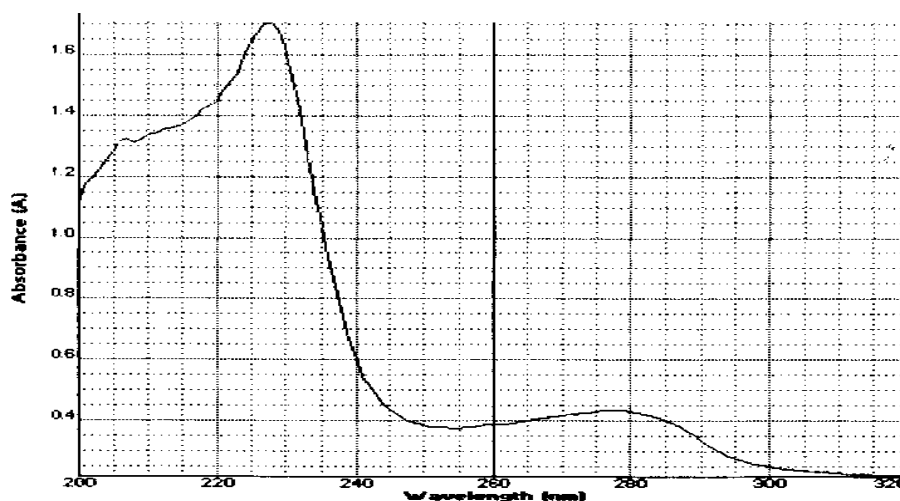
$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

Hodnota absorbance závisí dále na absorpčním koeficientu ϵ , který je charakteristický pro danou látku [12, 13, 14, 15]. Látky, které obsahují skupiny schopné absorpce

ultrafialového nebo viditelného záření a mají vysokou hodnotu ϵ , lze stanovovat přímo. Naopak látky, které takovou schopnost nemají, nebo mají nízkou hodnotu ϵ , se musí nejprve pomocí chemických reakcí převést na absorbující sloučeniny [12, 13]. Tyto metody budou podrobněji popsány v následující části této práce.

1.2.1 Přímé spektrometrické stanovení proteinů

Přímé metody lze definovat jako stanovení, při kterých se využívá určité vlastnosti zkoumané látky. K těmto metodám řadíme například spektrofotometrické stanovení proteinů v UV oblasti, kde měříme absorbanci peptidové vazby nebo absorbanci aromatických aminokyselin [3]. Princip tohoto stanovení je možné vysvětlit na příkladu sérového albuminu.



Obr 1.1 Spektrum bílkoviny BSA ve fyziologickém roztoku změřené na spektrofotometru NanoVue Plus. (osa x absorbance, osa y vlnová délka [nm]), převzato z práce [16]

V absorpčním spektru BSA (Obr. 1.1) v UV oblasti pozorujeme dvě absorpční maxima. První je v oblasti 200 - 230 nm, kde absorbují především peptidové vazby, a druhý se nachází v oblasti 260 - 280 nm, kde absorbují záření aromatické

aminokyseliny. Tento pík v oblasti 280 nm je dán především příspěvkem tyrosin a tryptofan a v menší míře i fenyylalanin [17, 18], a disulfidové vazby cysteinu [17], jejichž absorpční můžeme také zanedbat. Pro většinu proteinů dosahuje absorpce roztoku o koncentraci 1g/l při 280 nm hodnoty okolo 1. U sérového albuminu (HSA i BSA) je vzhledem k již zmíněným zvláštnostem v aminokyselinovém složení hodnota absorpce nižší, pohybuje se mezi 0,5 – 0,7 [2]. Nižší hodnota je dána tím, že sérový albumin obsahuje ve své molekule méně tryptofanu oproti „průměrnému proteinu“ [2].

Další možnost přímého stanovení poskytuje měření absorpce při nižších vlnových délkách, obvykle 205 až 220 nm. Hlavní absorbující skupinou je zde peptidová vazba, proto je stanovení méně závislé na aminokyselinovém složení [19]. O obou těchto postupech je pojednáno podrobněji.

- Měření absorpce při vlnové délce 280 nm

Přímé měření absorpce proteinu při 280 nm je široce používané [20] a lze jím stanovit koncentraci proteinu v rozmezí 20 – 3000 µg/ml [17]. Koncentraci proteinu se určuje porovnáním naměřené absorpce s připravenou kalibrační křivkou, nebo je vypočítána přímo z rovnice:

$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

Hodnotu ϵ je možné vypočítat na základě aminokyselinového složení nebo ji lze zjistit z literatury [17]. Hodnota tohoto koeficientu také může být stanovena experimentálně, pokud známe přesnou koncentraci proteinu. Existuje řada studií, které se zabývaly výpočtem extinkčního koeficientu [6, 11]. Pro výpočet molárního absorpčního koeficientu byla odvozena [11] rovnice:

$$\epsilon_{280} = (X_{\text{Trp}})5500 + (X_{\text{Tyr}})1490 + (X_{\text{Cys}})125 \quad (2)$$

kde X značí počet daných aminokyselinových zbytků v příslušném proteinu. Takto vypočtený koeficient je dostatečně spolehlivý, obsahuje-li protein tryptofanové zbytky [11, 17]. Jak je z uvedené rovnice vidět, hodnota molárního koeficientu je závislá na

složení proteinu. Další možností, jak zjistit hodnotu ϵ , je použití kalkulátorů, které jsou přístupné na internetu. Tyto kalkulátory vypočtou hodnotu ϵ po zadání celé aminokyselinové sekvence proteinu [21, 22, 23], nebo po zadání písmenného kódu příslušného proteinu [21, 22].

Pro praktické použití je obvykle výhodnější korelovat hodnotu absorbance s hmotností koncentrací pomocí veličin E_1 % (absorbance 1 % roztoku) nebo E_{ma} (absorbance roztoku o koncentraci 1 mg/ml). Hodnota E_{ma} může v mezních případech nabývat hodnot od 0,32 až do 8,37 ml/mg·cm v závislosti na aminokyselinovém složení proteinu [20], pro orientační měření směsí proteinů lze často použít hodnoty 1,0 ml/mg·cm.

Metoda stanovení proteinů při vlnové délce 280 nm se často používá [17] a to především proto, že se jedná o rychlou, nedestruktivní a jednoduchou metodu [17, 19]. Detekční limit (nejnižší hodnota signálu, kterou lze kvantifikovat) této metody je vyšší než u kolorimetrických metod [17].

Nevýhodou této metody je především výrazná závislost na složení proteinu a jeho konformaci. Dále existuje řada látek, které toto stanovení ruší [17].

Také nukleové kyseliny absorbují záření v oblasti 280 nm, absorpční maximum mají při vlnové délce 260 nm [24]. Jejich absorbance je až 10 x vyšší (vztaženo na jednotku hmotnosti) než absorbance proteinů při 280 nm [25, 26]. Vliv lze eliminovat současným měřením absorbance při 280 nm a 260 nm [17, 24, 25]. Při vlnové délce 260 nm je záření absorbováno purinovými a pyrimidinovými bázemi [27] a nukleové kyseliny tak mohou být detekovány izolovaně [25]. Lze tak stanovovat koncentraci proteinů v přítomnosti nukleových kyselin [17, 25]. Podle dat uvedených v práci Christiana a Warburga [26] byla navržena [24] pro stanovení proteinů v přítomnosti nukleových kyselin následující rovnice:

$$c_p = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260} \quad (3)$$

kde c_p značí koncentraci proteinu v mg/ml, A_{280} a A_{260} jsou hodnoty absorbancí pro příslušné vlnové délky. Podle novějších výpočtů jsou data Christiana a Warburga lépe

popsána rovnicí [24]:

$$c_p = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad (4)$$

Tato rovnice (označovaná obvykle v literatuře ne zcela přesně jako „stanovení podle Christiana a Warburga“) je použitelná až do koncentrace nukleových kyselin 20 % w/v [17] a stanovují se jí koncentrace proteinů 200 – 2000 µg/ml [25].

- Měření absorbance při vlnové délce 205 nm

Další metodou, jak se dají přímou spektrometrií stanovit proteiny, je měření absorbance při 205 nm, které je založeno na absorpci záření peptidovými vazbami [17, 19, 28]. K absorbanci při 205 nm dále přispívají: tryptofan, fenylalanin, tyrosin, histidin, cystein, methionin a arginin, ale jejich příspěvek je v porovnání s absorpcí peptidové vazby nízký [19]. Absorpce při 205 nm je také několikanásobně vyšší než při vlnové délce 280 nm [17, 28], takže se dají touto metodou stanovit nižší koncentrace proteinů, a to v rozmezí 1 – 100 µg/ml [17]. K zjištění koncentrace proteinu ve vzorku se používá porovnání s kalibrační přímkou, která je v širším rozsahu, než je tomu při 280 nm [20]. Nebo se opět použije přímý výpočet (rovnice 1), s tím rozdílem, že se použijí hodnoty pro 205 nm. Hodnota E_{ma} se při vlnové délce 205 nm pohybuje v rozmezí 30 – 35 ml/mg·cm [20, 27]. Přesná hodnota může být vypočtena pomocí následující rovnice, kterou navrhl Scopes [28]:

$$E_{ma} = 27,0 + 120 \cdot (A_{280}/A_{205}) \quad (5)$$

nebo můžeme využít průměrné hodnoty tohoto koeficientu uváděné v literatuře 31 ml/mg·cm [17], pak ale není stanovení koncentrace tak přesné.

I tato metoda je jednoduchá, citlivá a rychlá [17, 19]. Při porovnání se stanovením při 280 nm není tak silně závislá na aminokyselinovém složení proteinu. Nevýhodou omezující použitelnost tohoto postupu v reálných matricích je, že při vlnové

délce 205 nm ruší stanovení celá řada látek, například hem [19], EDTA s koncentrací nad 0,2mmol/l, SDS s koncentrací nad 0,10 % w/v [17], fosfátový pufr s koncentrací nad 50 mmol/l a další pufr [17, 19].

1.2.2 Metody založené na vzniku barevného produktu

Principem řady metod pro stanovení proteinů je využití vazby mezi měďnatými ionty a NH-skupinou peptidové vazby v silně alkalickém prostředí (biuretová reakce). Vzniká červený komplex, který má absorpční maximum v oblasti 540 – 560 nm. Zjišťujeme-li koncentraci měřením absorbance tohoto komplexu, jedná se o stanovení biuretovou metodou.

Pro analytické účely je vhodné využít zesílení reakcí s dalšími činidly, např. Folinovým činidlem nebo s bicinchoninovou kyselinou. Dosahuje se tak výrazného zvýšení citlivosti. O jednotlivých přístupech pojednám podrobněji.

- Stanovení biuretovou metodou

Metoda je založena na vzniku červeného komplexu, jehož absorbance se měří asi po 15 minutách při vlnové délce v oblasti 540 – 560 nm [20, 30].

Biuretovou metodou se dají stanovit koncentrace proteinu v rozsahu 200 – 2000 µg/ml [25]. Výhodou metody je jednoduchost, rychlost a dostatečná přesnost [25]. Metoda je relativně málo citlivá na složení proteinu, jak pokud jde o pozici absorpčního maxima, tak pokud jde o hodnotu absorpčního koeficientu [30].

Interferenci při měření způsobují především amonné ionty a dále pak ionty sodné, sulfáty, siřičitany nebo metanol, pokud je jejich koncentrace ve vzorku vyšší než 2 % [29]. Stanovení dále ruší například glukosa a jiné látky, které způsobují redukci měďnatých iontů [31], jako již zmíněné amonné ionty.

- Lowryho metoda

Tato metoda se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je již zmíněná biuretová reakce, kdy proteiny reagují s měďnatými ionty v alkalickém prostředí, a poté následuje

reakce s Folinovým činidlem (roztok kyseliny fosfomolybdenové a kyseliny fosfowolframové). Aminokyseliny tyrosin a tryptofan, které jsou obsaženy v proteinech, způsobí redukci Folinova činidla a tím dochází ke vzniku modře zbarveného produktu, který má absorpční maximum při vlnové délce 750 nm. Absorbance se měří po 30 a více minutách [25, 32].

Lowryho metoda je dostatečně citlivá pro stanovení koncentrace proteinů v rozmezí 5 – 250 µg/ml [25, 32], což znamená, že zmíněnou modifikací biuretové reakce (přidáním Folinova činidla) dochází ke zvýšení citlivosti stanovení o více než jeden řád.

Nevýhodou metody je skutečnost, že stanovení ruší celá řada látek. Interferenci mohou způsobovat například síran amonný, glycin, fenoly, močovina, kyselina trichloroctová, aceton a další látky [32]. Látky jako Tris nebo etanol způsobují výraznější interferenci, kdy dochází ke zvýšení zdánlivé koncentrace celkového proteinu o více než 20 % [31]. Další nevýhodou metody podle Lowryho je velice výrazná závislost intenzity zbarvení vzniklého komplexu na aminokyselinovém složení proteinu [32].

- Stanovení proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny

Dalším možností modifikace biuretové metody je reakce produktu s kyselinou bicinchoninovou, kdy po redukci měďnatého iontu na měďný iont proteinem vzniká červeně zbarvený komplex této kyseliny s měďnými ionty [18]. Po 30 minutách stání se měří absorbance vzniklého komplexu při vlnové délce 562 nm [33, 34].

Metodou se dají stanovit koncentrace proteinů v rozmezí 4 – 400 µl/ml [25], takže touto modifikací biuretové reakce, podobně jako u Lowryho metody, dochází ke zvýšení citlivosti stanovení o více než jeden řád.

Při použití této metody způsobují interferenci především redukující látky, cystein nebo cukry, a také chelatační činidla, jakým je EDTA [34, 35]. Stanovení proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny je v současnosti často používané, stejně jako stanovení proteinů Lowryho metodou, protože se jedná o jednoduchý postup a přitom je metoda dostatečně citlivá. Vzniklé zbarvení roztoku je stabilní [35] a příprava reakčního roztoku je jednoduchá.

1.2.3 Metody založené na vzniku komplexu barvivo – protein

Principem těchto metod je vazba barviva na protein za vzniku barevného komplexu protein-barvivo, jehož absorpční spektrum se liší od spektra volného barviva. Podrobněji se zmíním o dvou častěji používaných postupech.

- Metoda podle Bradfordové

Základem této metody je použití barviva Coomassie Brilliant Blue G-250. Volné barvivo má absorpční maximum při vlnové délce 465 nm. Reakcí s proteiny za laboratorní teploty poměrně rychle vzniká komplex barvivo-protein, který má intenzivní modré zabarvení [36, 37], absorpční maximum se posunuje k hodnotě 595 nm [25, 36].

Touto metodou lze stanovit proteiny a polypeptidy, které mají relativní molekulovou hmotnost vyšší než 3000 [36]. Na aminokyseliny a polypeptidy s nižší molekulovou hmotností se barvivo CBB neváže a nedochází ke vzniku komplexu protein-barvivo [31].

Metoda je vysoce citlivá a využitelná pro stanovení koncentrace v rozmezí 1 – 100 µg/ml [38]. V porovnání s Lowryho metodou nebo se stanovením pomocí BCA je tedy třikrát až čtyřikrát citlivější. Také při měření albuminu a řady globulárních proteinů je tato metoda velmi citlivá [18].

Interferenci zde způsobují především detergenty jako SDS [37]. Metoda je závislá na aminokyselinovém složení, vyšší odpověď poskytuje barvivo CBB G-250 s proteiny, které obsahují více bazických a aromatických aminokyselin [39], což má za následek různou odpověď v závislosti na složení proteinu. Volné aminokyseliny a cukry, které způsobují interferenci u Lowryho metody, toto stanovení neruší [36]. Při dalším porovnání s Lowryho metodou je toto stanovení rychlejší a jednodušší [38].

- Metody založené na proteinové chybě pH indikátoru

Principem těchto metod je barevná změna roztoku, ke které dojde po navázání indikátoru na protein (vznik komplexu barvivo-protein). Při tom dochází k narušení rovnováhy mezi kyselou a bazickou formou pH indikátoru a tedy ke změně pK_a barviva

v důsledku jeho navázání na protein [40]. Lopperová a Martin při své práci použili jako barvivo neutrální červeň a fenolovou červeň [41]. Barvivo bromfenolovou modř (BPB) pak ve svých pracích použili Free a kolektiv [42] nebo Wei a kolektiv [43].

Například při použití barviva BPB dochází ke vzniku komplexu, který se vyznačuje výrazným absorpčním maximem při vlnové délce 610 nm. Vztah mezi absorbancí a koncentrací je téměř lineární v rozsahu 10 – 80 µg proteinu a absorbance se může měřit prakticky okamžitě, na rozdíl od Lowryho metody, a je stálá po dobu 8 hodin [44].

Další barvivo, které se může při stanovení použít, je bromkresolová zeleň, kdy dochází k nárůstu absorbance při 628 nm a vztah mezi absorbancí a koncentrací proteinu je lineární až do koncentrace 60 g/l [45].

Všechny tyto metody jsou rychlé, jednoduché a spolehlivé, navíc mají málo interferencí. V porovnání s Lowryho metodou nebo stanovením podle Bradfordové může být ve vzorku přítomen fenol nebo SDS v koncentracích, ve kterých by při těchto stanoveních způsobovaly silné interference [44].

1.3 Spektrofotometry pro měření malých objemů vzorků

V posledních letech se na trhu začaly objevovat spektrofotometry, které jsou schopné měřit malé objemy vzorků (jednotky µl). Takovéto přístroje nacházejí uplatnění v biochemických laboratořích. Mezi ně patří například spektrofotometr Genova Nano – výrobce Jenway [46], Colibri – výrobce Titertek Berthold [47], NanoDrop – výrobce Thermo Scientific [48], NanoPhotometer Pearl – výrobce Implen [48] nebo NanoVueTM Plus – výrobce GE Healthcare [49]. Většina spektrofotometrů měřících malé objemy vzorků má již přednastavené metody pro stanovení nukleových kyselin a proteinů. Jedním z těchto přístrojů je například spektrofotometr NanoVueTM Plus, který byl použit při vypracování této diplomové práce. Protože se jedná o poměrně nový přístroj na trhu, jsou dostupné pouze informace uváděné v uživatelské příručce nebo v propagačních materiálech.

1.3.1 Spektrofotometr NanoVue™ Plus

Všechny uvedené informace o přístroji NanoVue Plus byly získány z příručky pro uživatele dodané spolu s přístrojem [50], z propagačních materiálů [49] a protokolů [51].

Spektrofotometr NanoVue™ Plus je přístroj, u kterého se nanáší vzorek okolo 2 µl na hydrofobní destičku.

Protože se dají na přístroji nastavit dvě hodnoty optické dráhy (0,5 mm a 0,2 mm), mohou se měřit roztoky s vyšší koncentrací proteinu, než je možné na obvyklých spektrofotometrech, kde je délka absorbujícího prostředí (optická dráha) dána délkou použité kyvety (obvykle 2 až 10 mm). Ze stejného důvodu ale není možné měřit nižší koncentrace, protože naměřená absorbance by byla příliš nízká, ne-li nulová. Přístroj sám po prvním změření vzorku automaticky nastaví optickou dráhu v závislosti na naměřené hodnotě absorbance. Pokud by byla absorbance vyšší než 1,7, použije optickou dráhu 0,2 mm.

Přístroj je vynulován až poté, co je splněna podmínka, že u dvou po sobě následujících měřeních srovnávacího vzorku se nesmí hodnoty naměřených absorbancí lišit o více než 0,02 A.

Již výše bylo napsáno, že v přístroji jsou naprogramovány metody pro stanovení proteinů a nukleových kyselin.

Přednastavené programy využívají ke zjištění koncentrace proteinů měření absorbance v ultrafialové a viditelné oblasti světla. Jsou zde programy pro stanovení pomocí BCA, podle Bradfordové, podle Lowryho a stanovení biuretovou reakcí. Ve své práci se zaměřuji na přímé spektrometrické metody, tedy na programy založené na absorbanci v UV oblasti. Jsou to programy **Protein UV**, program **BSA**, program **Christian-Warburg**, **E 1%** a **Mass Extinction**. Všechny tyto programy byly použity v experimentální části této práce, a budou popsány detailněji v následujícím textu.

- Program ***Protein UV*** a ***Christian-Warburg***

Koncentrace proteinu je v těchto programech vypočtena podle stejné rovnice:

$$c \text{ (mg/ml)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad (6)$$

Rozdíl mezi metodou ***Protein UV*** a ***Christian-Warburg*** je, že u metody ***Protein UV*** se dají nastavit jiné hodnoty než 1,55 a 0,76.

- Program ***BSA*** a ***E 1%***

Koncentrace proteinu je u těchto dvou programů vypočtena podle rovnice:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (A_{280} \cdot 10000) / E_{1\%} \quad (7)$$

kde $E_{1\%}$ je extinkční koeficient, který je v případě programu ***BSA*** přednastaven na hodnotu 6,7 a u programu ***E 1%*** se dá nastavit. Hodnotu koeficientu lze zjistit experimentálně. Odpovídá totiž absorbanci 1 % w/w roztoku naměřené při vlnové délce 280 nm a délce absorbujícího prostředí 1 cm.

- Program ***Mass extinction***

U tohoto programu je koncentrace proteinu vypočtena podle rovnice:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (A_{280} \cdot 1000) / E_{ma} \quad (8)$$

kde výrobcem zvolená zkratka E_{ma} označuje hmotnostní extinkční koeficient, jehož hodnota se dá zjistit experimentálně. Odpovídá absorbanci roztoku o koncentraci 1 mg/ml naměřené při 280 nm při délce absorbujícího prostředí 1 cm.

Nevýhodou tohoto přístroje je, že se zde nedají měřit vzorky obsahující příliš těkavá rozpouštědla a vzorky příliš nízkých koncentrací. Je nutné, aby kapka vzorku

nanášená na plochu pro vzorek nezpůsobila poškození této destičky. Takové poškození může způsobit například 2 mol/l roztok NaOH nebo HCl při kontaktu delším než 2 minuty. Také je důležité, aby nanášená kapka měla „dobrý tvar“ a nedocházelo k narušení její symetrie.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie a přístroje

Hovězí sérový albumin (frakce V) – Merck, Německo

Lidský sérový albumin – Imuna, SR

α -Laktalbumin – Sigma-Aldrich, USA

Lysozym – Sigma-Aldrich, USA

Vaječný albumin – Lachema, ČR

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p. a. – Penta, ČR

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. – Lachema, ČR

Propan-2-ol – Lachema, ČR

pH-metr – HI 2211 pH/ORP Meter, HANNA Instruments

NanoVue™ Plus Spectrophotometr, GE Healthcare

UV-VIS spektrofotometr s diodovým polem Hewlett-Packard 8453E, Hewlett-Packard

Ubrousky Kimtech, Kimberly-Clark

2.2 Příprava zásobních roztoků

Fosforečnanový pufr 0,1 mol/l o pH 7,5 byl připraven smísením 38 ml 0,2 mol/l roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného se 162 ml 0,2 mol/l roztoku hydrogenfosforečnanu disodného a doplněním destilovanou vodou do celkového objemu 400 ml [18].

Zásobní roztok hovězího sérového albuminu o přibližné koncentraci 50 g/l byl připraven navážením 50,92 mg hovězího sérového albuminu a jeho rozpuštěním v 1 ml 0,1 mol/l fosforečnanového pufru pH 7,5. Stejným způsobem byly připraveny i zásobní roztoky lidského sérového albuminu, α -laktalbuminu, lysozymu a zásobní roztok vaječného albuminu o přibližné koncentraci 10 g/l. Lidského sérového albuminu bylo naváženo 12,74 mg, α -laktalbuminu bylo naváženo 10,53 mg, lysozymu bylo naváženo

11,06 mg a vaječného albuminu bylo naváženo 10,45 mg.

S takto připravenými zásobními roztoky bylo dále pracováno při přípravě měřených roztoků.

2.3 Postup práce

2.3.1 Měření a zpracování získaných dat

Měření byla prováděna na spektrofotometru NanoVue™ Plus a UV-VIS spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E s diodovým polem. Přesná nastavení přístrojů jsou uváděna u jednotlivých postupů práce. Data naměřená na přístroji NanoVue™ Plus byla zapsána a následně zpracována v programu Microsoft Office Excel 2010. Data naměřená na spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E byla uložena ve formátu CSV a následně byla zpracována v programu Microsoft Office Excel 2010.

2.3.2 Vliv velikosti nanášeného objemu

Na přístroji NanoVue™ Plus byl použit program pro měření při několika vlnových délkách (**Multiwavelength**). Vlnové délky byly nastaveny na hodnoty 260, 280, 400, 500 a 600 nm. Optická dráha (*Pathlength*) byla nastavena na 0,5 mm. Přístroj byl vynulován a vzorek byl 10x změřen bez zvednutí horního krytu. Destilovaná voda byla použita jako blank i jako vzorek. Poté byla plocha pro vzorek i horní kryt otřeny ubrouskem. Přístroj byl znovu vynulován a byl nanesen nový vzorek. Po jeho změření byl horní kryt zvednut a nanesený vzorek byl odstraněn. Měření vzorku se zvednutím krytu a otřením obou ploch ubrouskem a novým nanesením vzorku bylo provedeno 10x. Tyto postupy byly provedeny nejprve s destilovanou vodou použitou jako blank i jako vzorek a poté s roztokem fosforečnanového pufru o pH 7,5, který byl použit také jako blank a posléze jako vzorek. V případě obou použitých roztoků byly postupně při měřeních nanášeny vzorky o objemu 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 a 5 µl. Vzorky byly nanášeny na plochu pro vzorek pomocí pipety.

Pro zjištění „stability nuly“ byly použity programy *Christian-Warburg*, program *BSA*, program *Mass extinction*, program *EI%* a program *Protein UV*.

U programu *Mass extinction* a programu *E1%* byly nastaveny hodnoty extinkčních koeficientů, které byly nejprve experimentálně zjištěny. U všech použitých programů byly nastaveny hodnoty optické dráhy (*Pathlength*) automatické, ředící faktor (*Dilution Factor*) 1, korekce pozadí (*Background*) zapnuta a jednotky koncentrace byly nastaveny na mg/ml. Vzorky byly nanášeny pomocí pipety na plochu pro vzorek, dávkovaný objem byl 4,5 μ l.

U vybraných programů bylo měření provedeno s destilovanou vodou a roztokem fosforečnanového pufru pH 7,5. Oba roztoky byly použity jako blank pro vynulování a poté jako vzorek pro měření koncentrace. Pokaždé bylo provedeno 10 měření. Mezi jednotlivými měřeními byla plocha pro vzorek a horní kryt ořeny. Vždy při změně programu byly plochy čištěny propan-2-olem a poté byly omyty destilovanou vodou.

2.3.3 Roztoky hovězího sérového albuminu

Do označených plastových mikrozkušavek byly připraveny roztoky o různých koncentracích BSA o celkovém objemu 250 μ l, obsahujících příslušné množství 0,1 mol/l fosfátového pufru o pH 7,5 a zásobního roztoku BSA o koncentraci 50,92 mg/ml. Byly připraveny roztoky BSA s koncentrací 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25 a 30 mg/ml. Po napipetování daných objemů byly jednotlivé roztoky důkladně promíchány.

Takto připravené roztoky byly měřeny na spektrofotometru NanoVue™ Plus za použití přednastavených a uložených programů. Byly použity programy *Protein UV* a *Protein A280*. V programu Protein A280 byly použity programy *Christian-Warburg*, program *BSA* s již nastaveným extinkčním koeficientem ($E_{1\%}$) 6,7, program *Mass extinction* a program *E1%*. U programů *Mass extinction* a *E1%* byly nastaveny hodnoty hmotnostního extinkčního koeficientu 0,704 a hodnoty extinkčního koeficientu ($E_{1\%}$) 6,16, které byly zjištěny experimentálně (viz postup 2.3.6 a 2.3.7).

U všech použitých programů byly nastaveny následující parametry: optická dráha – automatická; ředící faktor – 1; korekce pozadí – zapnuta a jednotky koncentrace byly nastaveny na mg/ml.

Vzorky byly nanášeny pomocí pipety na plochu pro vzorek. Nanášený objem byl 4,5 μ l. Jako blank byl použit roztok fosforečnanového pufru o pH 7,5. Spektrofotometr

byl vždy po šesti měřeních vynulován. Po každém měření byla plocha pro vzorky a horní kryt otřeny ubrouskem. Dále byla plocha pro vzorky čištěna propan-2-olem a destilovanou vodou a to vždy po šesti měřeních.

2.3.4 Měření dalších roztoků proteinů

Do označených plastových mikrozkušavek byly připraveny roztoky HSA, vaječného albuminu, α -laktalbuminu a lysozymu o koncentracích 5 mg/ml, 3 mg/ml a 1 mg/ml. Roztoky byly připraveny smísením příslušných množství 0,1 mol/l roztoku fosforečnanového pufru o pH 7,5 a zásobních roztoků daných proteinů. Po napipetování daných objemů byly jednotlivé roztoky důkladně promíchány. Připravené roztoky proteinů byly měřeny na spektrometru NanoVueTM plus za použití programu **Protein UV** a programu **E 1%**, u obou programů byly nastaveny následující parametry: optická dráha – automatická; ředící faktor – 1; korekce pozadí – zapnuta a jednotky koncentrace byly nastaveny na mg/ml. Hodnoty koeficientu E1%, které byly zadávány pro jednotlivé proteiny, jsou uvedeny v tabulce 3.3 na str. 40. Při měření byl použit jako srovnávací roztok fosfátový pufr, objem nanášených vzorků byl 4,5 μ l. Po každém měření byla plocha pro vzorky a horní kryt otřeny ubrouskem. Dále byla plocha pro vzorky čištěna propan-2-olem a destilovanou vodou.

2.3.5 Měření spektra proteinů

Byla změřena absorpční spektra proteinů (BSA, HSA, α -laktalbuminu, vaječného albuminu a lysozymu) o koncentraci 1 mg/ml. Jako blank byl použit fosfátový pufr. Měření bylo provedeno na spektrofotometru NanoVueTM Plus a na spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E.

Na spektrofotometru NanoVueTM Plus byl použit program pro měření celého spektra (**Wavescan**), byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 200 – 400 nm a optická dráha byla nastavena na 0,5 mm. Nanášený objem roztoků byl 4,5 μ l.

Na spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E bylo nastaveno rozmezí vlnových délek 200 – 400 nm, integrační čas 5 sekund a interval 1 nm. Měření bylo prováděno v křemenných kyvetách.

2.3.6 Stanovení hmotnostního extinkčního koeficientu

Pro zjištění hmotnostního extinkčního koeficientu byl použit roztok BSA o koncentraci 1 mg/ml. Na přístroji NanoVue™ Plus byl použit program pro měření při jedné vlnové délce (program *Single wavelength*), byla nastavena vlnová délka 280 nm a optická dráha byla 0,5 mm. Na plochu pro vzorek byl nanášen objem 4,5 µl roztoku. Bylo provedeno 5 měření. Mezi jednotlivými měřeními byla plocha pro vzorky a horní kryt otřeny ubrouskem. Získané hodnoty absorbance při 280 nm byly vynásobeny 20 a byl vypočten průměr těchto hodnot. Takto získaná hodnota extinkčního koeficientu pak byla dále použita pro měření v program *Mass extinction*. Jako blank byl použit roztok fosforečnanového pufru o pH 7,5.

2.3.7 Stanovení extinkčního koeficientu E1%

Pro zjištění hodnot extinkčních koeficientů E1% byly použity 1 % w/w roztoky příslušných proteinů. Byly použity následující proteiny: BSA, HSA, vaječný albumin, lysozym a α -laktalbumin. Roztoky byly připraveny navážením příslušného množství daného proteinu a roztoku fosforečnanového pufru pH 7,5.

Na přístroji NanoVue™ Plus byl použit program pro měření při jedné vlnové délce. Hodnota vlnové délky byla nastavena na 280 nm a optická dráha 0,5 mm. Na plochu pro vzorek bylo nanášeno 4,5 µl roztoku. Jako blank byl použit roztok fosforečnanového pufru o pH 7,5. Bylo provedeno 5 měření a mezi jednotlivými měřeními byla plocha pro vzorek a horní kryt otřeny ubrouskem. Získané hodnoty absorbancí při vlnové délce 280 nm byly vynásobeny 20 a byla vypočtena jejich průměrná hodnota. Takto získané hodnoty extinkčních koeficientů byly poté použity při měření v programu *E1%*.

2.3.8 Stabilita hodnoty absorbance v čase

Byl použit roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 1 mg/ml. Na přístroji NanoVue™ Plus byla použita aplikace *Multiwavelength*. Vlnové délky byly nastaveny na hodnoty λ_1 260 nm a λ_2 280 nm, hodnota optické dráhy (*Pathlength*) byla nastavena na 0,5 mm. Byl nanesen objem 4,5 µl na plochu pro vzorky, jako blank

byl použit roztok fosforečnanového pufru pH 7,5. Hodnoty A_{260} a A_{280} byly měřeny v čase 0; 5; 10; 20; 30 a 40 minut. V čase 0 minut bylo provedeno první změření absorbance.

2.3.9 Sušení proteinů – zjištění množství obsažené vody v proteinu

Na zvážené a označené alobalové misticíky byla navážena příslušná množství proteinů, které byly sušeny po dobu 4 hodin při teplotě 105 °C. Po této době sušení by se už neměla dále měnit hmotnost proteinu dalším sušením, mělo by být dosaženo konstantní hmotnosti [52]. Po vychladnutí byly proteiny zváženy. Pro každý protein (BSA, HSA, lysozym, vaječný albumin, α -laktalbumin) bylo stanovení provedeno 2x. Byly naváženy proteiny o hmotnosti od 20 mg do 50 mg.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Technické parametry

3.1.1 Určení vhodného objemu nanášeného vzorku

V první části experimentu byl hledán vhodný objem pro dávkování vzorku. Výrobce přístroje je doporučováno rozmezí hodnot od 2 μl do 5 μl . Při tomto měření byla používána destilovaná voda a roztok fosforečnanového pufru pH 7,5.

Ze získaných hodnot (pro každý objem 10 měření) byl vypočten medián a výběrová směrodatná odchylka.

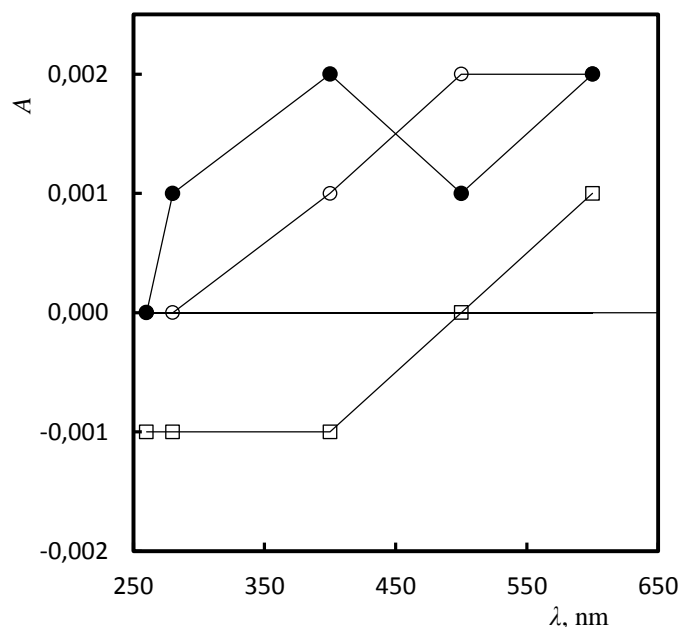
V první části měření byla použita destilovaná voda. Mediánové hodnoty naměřených absorbancí dosahovaly hodnot od 0,004 do -0,004. Pouze v případě nanášení vyšších objemů dosahovaly hodnoty absorbancí až -0,009. Výběrové směrodatné odchylky nepřesáhly hodnotu $\pm 0,003$.

Protože v dalších částech experimentu je používán roztok hovězího sérového albuminu ve fosforečnanovém pufru pH 7,5, byla stejná měření provedena i s roztokem tohoto pufru. Získané hodnoty (medián absorbance při různých vlnových délkách, \tilde{A}) pro různé objemy vzorků jsou znázorněny v tabulce 3.1.

Tab 3.1 Hodnoty absorbance, při zvolených vlnových délkách, pro dané objemy 0,1 mol/l fosforečnanového pufru o pH 7,5

Objem v μl	\tilde{A}_{260}	\tilde{A}_{280}	\tilde{A}_{400}	\tilde{A}_{500}	\tilde{A}_{600}
2	0,425	0,392	0,258	0,209	0,186
2,5	0,000	0,001	0,002	0,001	0,002
3	0,000	0,000	0,001	0,002	0,002
3,5	-0,004	0,000	-0,002	-0,002	-0,002
4	-0,004	-0,003	-0,002	-0,002	-0,002
4,5	-0,001	-0,001	-0,001	0,000	0,001
5	-0,003	-0,003	-0,002	-0,001	-0,001

Jak je z hodnot v tabulce 3.1 vidět, hodnoty absorbance (medián absorbance, \tilde{A}) při nanášení objemu vzorku 2 μl jsou výrazně odlišné od hodnot pro ostatní použité objemy. Při nanesení vzorku fosforečnanového pufru o objemu 2 μl na plochu pro vzorek a přiklopením horního krytu došlo k tomu, že nanesený vzorek nevyplnil vzniklou mezeru (0,5 mm) a vznikla tam vzduchová mezera. Paprsek světla procházel měřeným roztokem a vzduchovou mezerou. Tím byla výrazně ovlivněna hodnota naměřené absorbance. Výběrová směrodatná odchylka při použití objemu 2 μl dosahovala hodnoty až 0,097.



Obr 3.1 Výsledky získané při měření vybraných objemů 0,1 mol/l fosfátového pufru o pH 7,5 při pěti vlnových délkách

- označuje objem 2,5 μl ; ○ označuje objem 3 μl ; □ označuje objem 4,5 μl

Hodnoty absorbancí pro ostatní nanášené objemy pufru, se nijak výrazně neodchylují od nulové hodnoty absorbance. Jejich absorbance (medián absorbance, \tilde{A}) se neliší od nulové hodnoty o více než $\pm 0,004$. Hodnoty výběrových směrodatných odchylek, pro vzorky znázorněné v tabulce 3.1 (kromě objemu 2 μl), nepřesáhly

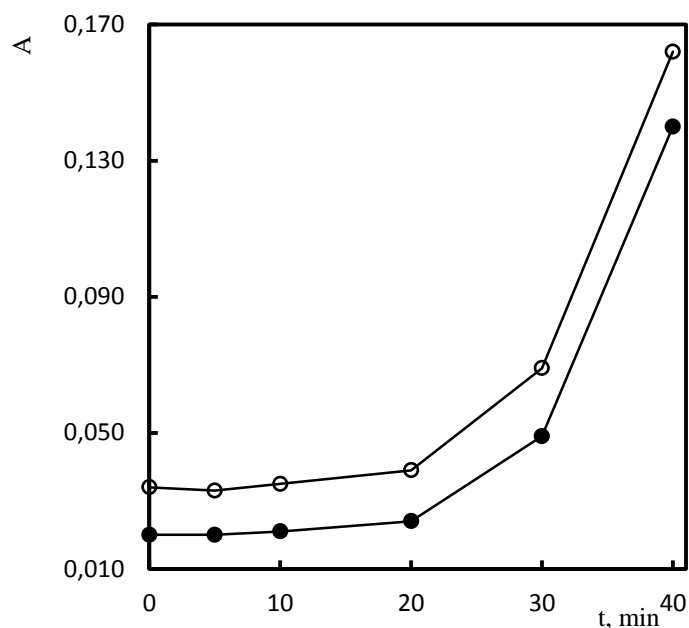
hodnotu $\pm 0,004$ a u objemů 4,5 μl a 5 μl nepřesáhly hodnotu $\pm 0,002$. Na obrázku 3.1 jsou pak znázorněny hodnoty absorbancí pro nanášené objemy, které se nejvíce blížily nulové hodnotě.

Při zjištění přesnosti vlastního spektrometrického měření, při nanesení a měření pufru, nepřesáhla výběrová směrodatná odchylka hodnotu 0,001 u nanášených objemů 2,5 – 5 μl . Zjištění přesnosti vlastního spektrofotometrického měření nebylo prováděno pro objem 2 μl .

Z hodnot, které byly získány při těchto měřeních, byl vybrán objem 4,5 μl jako objem, který bude používán v dalších prováděných měřeních. Tento objem byl vybrán proto, že hodnoty absorbancí, které byly naměřeny při nanášení objemu 4,5 μl , byly nejbližší nulové hodnotě absorbance.

3.1.2 Změny hodnoty absorbance v čase

Při měření na přístroji NanoVueTM Plus bylo nutné zjistit, zda nedochází k odpařování vzorku. Proto bylo sledováno, zda a popřípadě jak se změní hodnota absorbance v čase. Získané hodnoty jsou znázorněny na obrázku 3.2.



Obr 3.2 Závislost absorbance roztoku BSA v čase

○ hodnoty A_{280} , ● hodnoty A_{260} ; koncentrace BSA 1 mg/ml

Jak ukazuje průběh křivek na obrázku 3.2, hodnoty absorbance se začínají od 20. minuty zvedat. Další výrazný nárůst absorbance v 30. minutě může být způsoben odpařováním rozpouštědla a následně změnou koncentrace vzorku. Pravděpodobnější je však, že dalším vypařováním vzorku dochází k vytvoření mezery mezi „měřicími plochami“. Takto vzniklá vzduchová mezera v prostoru, kde roztok absorbuje elektromagnetické záření, vede k vysokému nárůstu absorbance, jak je vidět u hodnot absorbancí naměřených při 40 minutě.

Změny absorbance do dvacáté minuty jsou srovnatelné s chybou vlastního spektrofotometrického měření.

3.1.3 Odhad přesnosti měření při použití spektrofotometru NanoVue™ Plus

Pro případné analytické využití používaných metod v této práci je důležité

alespoň odhadnout přesnost měření jako celku a jednotlivých operací, z nichž se měření skládá. Pro zjištění přesnosti měření byl použit roztok BSA o koncentraci 1 mg/ml a byla měřena absorbance tohoto roztoku při vlnové délce 280 nm.

Přesnost vlastního spektrofotometrického měření přístroje NanoVue Plus byla zjištěna měřením naneseného vzorku, který byl měřen bez zvednutí horního krytu. Při tomto měření byla hodnota směrodatné odchylky 0,024 A, což odpovídá relativní směrodatné odchylce 3,53 %.

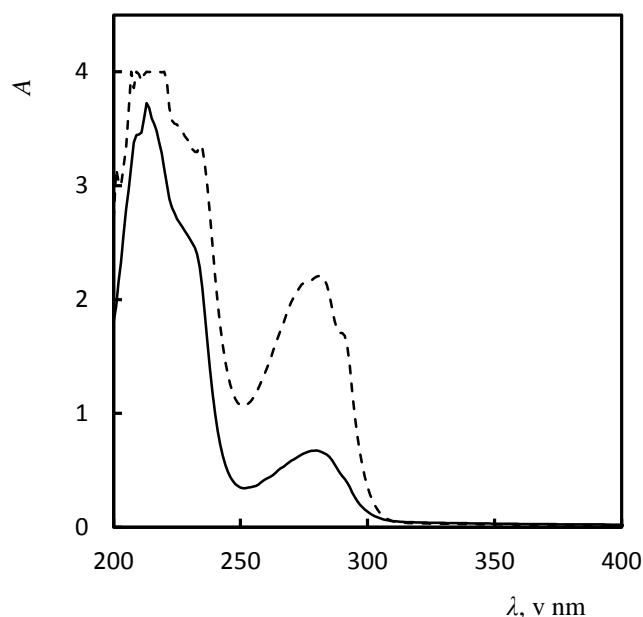
Takto zjištěná odchylka ale popisuje pouze vlastní spektrofotometrické měření, kdy je měřena stejná „kapka“ vzorku. Pro získání realističtějšího odhadu přesnosti spektrofotometrického kroku byly opakovaně nanášeny a měřeny vzorky proteinu. Přesnost byla opět charakterizována směrodatnou odchylkou, jejíž hodnota byla 0,077 A, což odpovídá relativní směrodatné odchylce 11 %.

Aby bylo možné odhadnout přesnost celého postupu, a ne pouze vlastního spektrofotometrického kroku, byly připraveny tři roztoky BSA a byla proměřena jejich absorbance. V tomto případě byla směrodatná odchylka 0,095 A, což odpovídá relativní směrodatné odchylce 13,97 %.

Z těchto údajů vyplývá, že největší podíl na nepřesnosti měření má operátor.

3.2 Porovnání spekter lysozymu a BSA získaných na různých spektrofotometrech

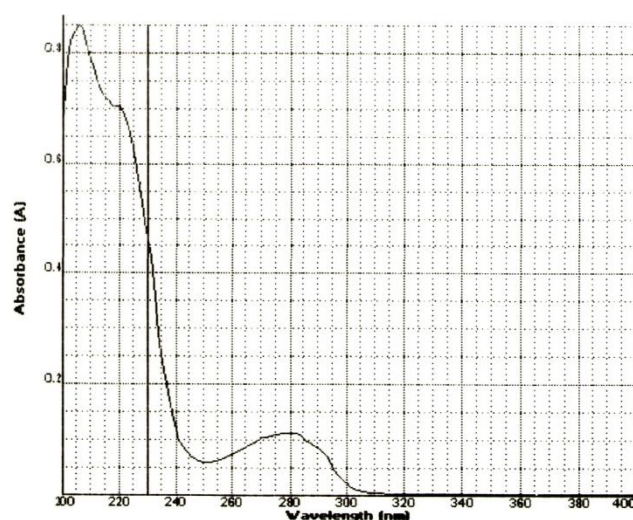
Byla porovnána spektra roztoků bílkovin (BSA a lysozymu) o teoretické koncentraci 1 mg/ml v 0,1 mol/l fosfátovém pufru o pH 7,5, získaných na přístroji NanovouTM Plus a spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E. Na obrázku 3.3 jsou znázorněna spektra lysozymu a BSA, která byla naměřena za použití spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E. Spektra proteinů získaná na přístroji NanoVueTM Plus jsou na obrázku 3.4 a 3.5. Protože byla na přístroji NanoVue Plus nastavena optická dráha na hodnotu 0,5 mm, jsou v tabulce 3.2 uvedeny i hodnoty absorbancí vynásobené dvaceti. To proto, aby mohly být porovnány hodnoty absorbancí získaných na těchto dvou přístrojích.



Obr 3.3 Absorpční spektrum lysozymu a BSA

Spektrum 1 mg/ml lysozymu (- - -) v 0,1 mol/l fosfátovém pufru pH 7,5; plná čára označuje spektrum 1mg/ml BSA v 0,1 mol/l fosfátovém pufru pH 7,5. Spektra byla naměřena na přístroji Hewlett-Packard 8453E za použití 1 cm křemenné kyvety.

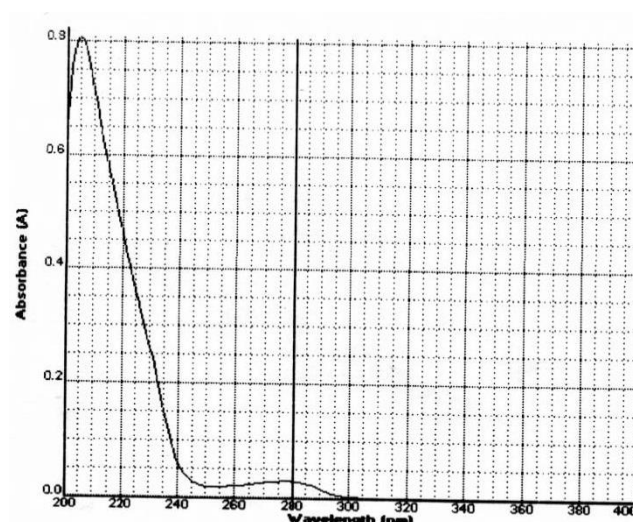
Na obrázku 3.3 pozorujeme, že hodnoty absorbancí při 280 nm jsou pro vybrané proteiny (BSA, lysozym) odlišné. Lysozym, který obsahuje více aromatických aminokyselin ve své molekule, má hodnoty A_{280} vyšší než roztok BSA. Hodnoty A_{280} pro lysozym jsou příliš vysoké. Chceme-li získat tyto hodnoty (A_{280}), musel by být roztok lysozymu zředěn tak, aby absorbance nepřesáhla hodnotu okolo 1,8, abychom se nacházeli v oblasti platnosti Lambertova-Beerova zákona, kde platí mezi absorbancí a koncentrací roztoku přímá úměra. Na obrázku 3.4 je znázorněno spektrum roztoku lysozymu získané na spektrofotometru NanoVueTM Plus. Zde je hodnota absorbance při 280 nm nižší. To je dáno tím, že délka absorbuujícího prostředí není 1 cm jako v předchozím případě, ale jen 0,5 mm. Hodnota absorbance by tedy měla být 20 krát nižší.



Obr 3.4 Spektrum lysozymu získané na přístroji NanoVue™ Plus

Spektrum lysozymu o teoretické koncentraci 1 mg/ml v 0,1 mol/l fosfátovém pufru pH 7,5, měřené na přístroji NanoVue™ Plus, optická dráha 0,5 mm, objem nanášeného vzorku 4,5 μ l.

Dále bylo na spektrofotometru NanoVue™ Plus měřeno spektrum roztoku BSA. I zde byla délka absorbujícího prostředí pouze 0,5 mm. Proto jsou tady hodnoty absorbancí (obrázek 3.5) také asi 20 krát nižší než hodnoty získané na druhém přístroji.



Obr 3.5 Spektrum BSA získané na přístroji NanoVue™ Plus

Spektrum BSA o teoretické koncentraci 1 mg/ml v 0,1 mol/l fosfátovém pufru pH 7,5, měřené na přístroji NanoVue™ Plus, optická dráha 0,5 mm, objem vzorku 4,5 μ l.

Na všech spektrech můžeme pozorovat píky v oblasti 205 nm a 280 nm, které jsou dány absorbcí peptidových vazeb a absorbcí aromatických aminokyselin. Na absorpčním spektru lysozymu (obr 3.4) můžeme vidět u píku v oblasti 205 nm „raménko“, u spektra BSA jej nepozorujeme. To je dáno tím, že lysozym obsahuje více aromatických aminokyselin než BSA a ty také přispívají k absorpci v oblasti vlnových délek (220 nm). V tabulce 3.2 jsou uvedeny hodnoty absorbcí při 205 a 280 nm získaných na těchto dvou spektrofotometrech.

Tab 3.2 Získané hodnoty A_{205} a A_{280} roztoků lysozymu a BSA

Teoretická koncentrace obou proteinů je 1 mg/ml. A_{BSA} značí absorpci roztoku BSA, A_L značí absorpci lysozymu.

λ v nm	NanoVue™ Plus				Hewlett-Packard 8453E	
	A_{BSA}	A_L	$20 \times A_{BSA}$	$20 \times A_L$	A_{BSA}	A_L
205	0,808	0,843	16,160	16,860	2,793	3,338
280	0,033	0,112	0,660	2,240	0,673	2,202

Z dat uvedených v tabulce 3.2 vidíme, že hodnoty A_{280} získané na přístroji NanoVue™ Plus a HP 8453E jsou stejné. To dokazuje, že spektrofotometr měřící malé objemy vzorků dává správné výsledky stejně jako spektrofotometr, kde je vzorek měřen v kyvetách. Díky tomu, že je délka absorbujícího prostředí pouze 0,5 mm nebo dokonce 0,2 mm, mohou být na přístroji NanoVue™ Plus měřeny vzorky s mnohem vyšší koncentrací, než by bylo možné na přístrojích, kde je vzorek měřen v kyvetách. Naopak vzorky s nižší koncentrací se na takovémto přístroji měřit nedají, protože by hodnoty absorbcí byly nulové. Hodnoty A_{205} již porovnat nelze, protože absorpce naměřená na přístroji HP 8453E byla příliš vysoká.

3.3 Stanovení proteinů

3.3.1 Stanovení extinčních koeficientů

Pro měření koncentrace v programech *Mass extinction* a *E 1%* bylo nutné zjistit hodnoty extinčních koeficientů pro jednotlivé bílkoviny. Hodnota hmotnostního extinčního koeficientu (zadávaná do programu *Mass extinction*) byla zjišťována pouze pro roztok BSA. Jeho hodnota byla 0,704 a hodnota výběrové směrodatné odchylky byla 0,036.

Hodnota extinčního koeficientu (E1%) byla zjišťována pro roztoky BSA, HSA, lysozymu, vaječného albuminu a α -laktalbuminu. Hodnoty tohoto koeficientu pro jednotlivé proteiny jsou uvedeny v tabulce 3.3.

Tab 3.3 Hodnoty extinčního koeficientu E1% a výběrové směrodatné odchylky

Protein	E1%	VSD
BSA	6,16	0,05
HSA	6,11	0,05
α -laktalbumin	18,69	0,05
Lysozym	24,68	0,05
Vaječný albumin	7,29	0,06

3.3.2 Měření koncentrace BSA zvolenými programy – „ověření použitelnosti“

Poté, co byl vybrán objem nanášeného vzorku a byly experimentálně zjištěny hodnoty hmotnostního extinčního koeficientu a extinčních koeficientů (E 1%), byla u zvolených programů nastavených v přístroji NanoVueTM Plus měřena koncentrace.

U všech pěti zvolených programů (program *Protein UV*, *BSA*, *Christian-Warburg*, *Mass extinction* a program *E 1%*) pro vzorky destilované vody nepřesáhl medián koncentrace hodnotu 0,03 mg/ml a výběrová směrodatná odchylka nepřesáhla

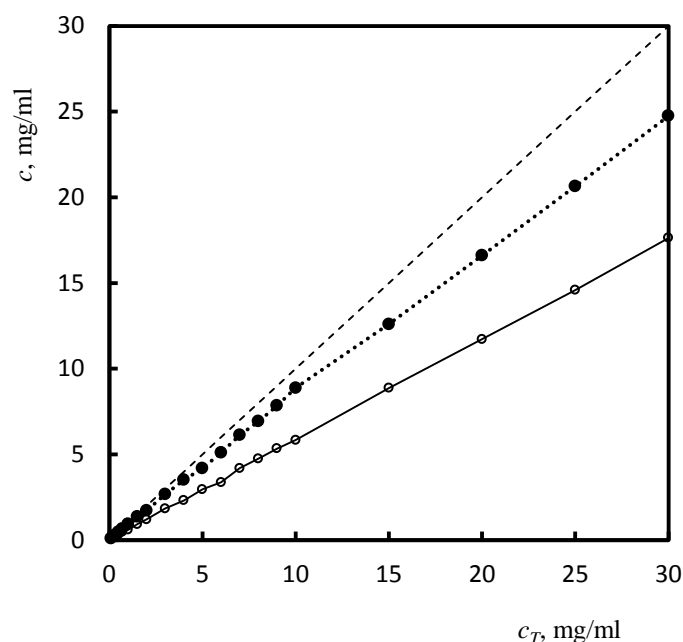
hodnotu $\pm 0,03$ mg/ml. Hodnoty získané měřením nulových vzorků jsou uvedeny v tabulce 3.4.

Tab 3.4 Koncentrace nulových vzorků a výběrové směrodatné odchylky VSD je označení pro výběrovou směrodatnou odchylku, c_{PU} je označení pro zdánlivou koncentraci proteinu ve fosfátovém pufru a c_{DV} je označení pro zdánlivou koncentraci proteinu v destilované vodě.

Program	c_{PU}	VSD	c_{DV}	VSD
	v mg/ml	v mg/ml	v mg/ml	v mg/ml
Protein UV	0,02	0,01	0,03	0,01
program BSA	0,01	0,02	0,01	0,02
Mass extinction	0,00	0,02	0,02	0,01
Christian-Warburg	0,02	0,02	0,01	0,01
program E1%	0,03	0,02	0,03	0,03

Jak je z předchozí tabulky vidět, mediány koncentrace pro vzorky obsahující pufr nepřesahují hodnotu 0,03 mg/ml a výběrová směrodatná odchylka není vyšší než 0,02 mg/ml.

V následující části tohoto měření již byl jako srovnávací roztok použit pufr a byly měřeny vzorky s odlišnou koncentrací proteinu. Koncentrace proteinu byly v rozmezí od 0,1 mg/ml do 30 mg/ml.

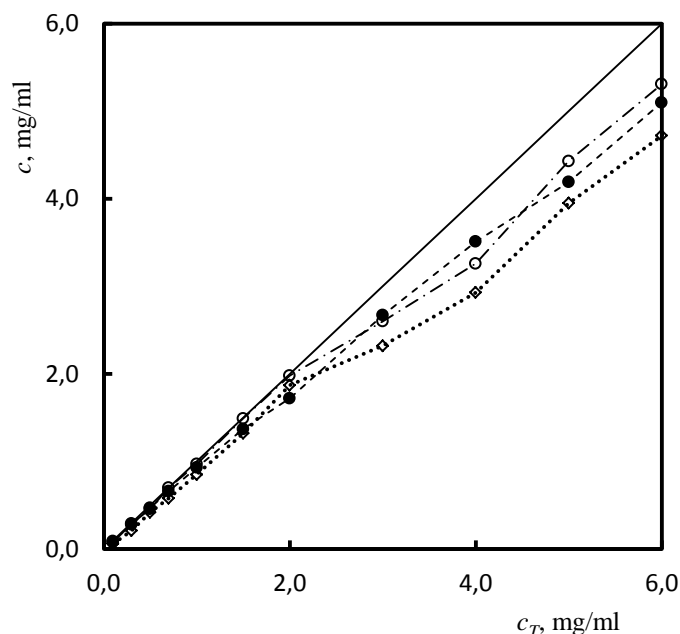


Obr 3.6 Výsledky získané při použití programu BSA a Protein UV

○ koncentrace BSA získaná při použití programu Protein UV; • označuje koncentraci BSA získanou při použití programu BSA a přerušovaná čára značí teoretickou koncentraci. Teoretická koncentrace BSA (c_T) v 0,1 mol/l fosfátovém pufru o pH 7,5 je 0,1; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25 a 30 mg/ml.

Na obrázku 3.6 můžeme porovnat teoretické hodnoty koncentrace BSA s hodnotami koncentrací získanými za použití dvou vybraných programů (program **BSA**, **Protein UV**). Pokud by byly do grafu zaneseny i hodnoty získané programy **E1%** a **Mass extinction**, podobaly by se hodnotám získaným při použití programu **BSA**. Hodnoty získané programem **Christian-Warburg** by splynuly s hodnotami získanými programem **Protein UV**. Jak je v grafu vidět, koncentrace získané programem **Protein UV** jsou značně nižší než hodnoty teoretické koncentrace proteinu. Tyto zdánlivě nižší hodnoty koncentrace jsou způsobeny tím, že v měřeném proteinu je v porovnání s jinými proteiny nižší zastoupení tryptofanu. V porovnání s „průměrným proteinem“ obsahuje v molekule pouze 2 tryptofany, zatímco „průměrný protein“ jich má 6 [2]. U roztoků BSA se rozdíl mezi teoretickou a naměřenou koncentrací pohyboval

v rozmezí 38,7 – 44,3 %. Tento pokles o přibližně 40 % je tedy způsoben složením BSA (nižší počet tryptofanů).



Obr 3.7 Výsledky získané při použití programu BSA, E1% a Mass extinction. Plná čára označuje teoretickou koncentraci, ◇ označuje koncentraci získanou při použití programu Mass extinction, • označuje hodnoty koncentrací získané při použití programu BSA a ○ označuje koncentraci získanou při použití programu E 1%. c_T - teoretická koncentrace BSA v 0,1 mol/l fosfátovém pufru o pH 7,5.

Na obrázku 3.7 je vidět, že se pro všechny tři metody naměřené koncentrace shodují s teoretickou koncentrací proteinu až do koncentrace proteinu 1 mg/ml. Od koncentrace 1,5 mg/ml je pak vidět pokles hodnot naměřených koncentrací oproti teoretické koncentraci. Rozdíl naměřených hodnot koncentrací pak můžeme pozorovat i u roztoků s vyšší koncentrací BSA, znázorněných na obrázku 3.6. Pokles koncentrace od teoretické hodnoty se u roztoků s koncentrací 3 – 30 mg/ml pohybuje v rozmezí 10 – 24 %.

Při porovnání hodnot koncentrací získaných při použití programu **BSA** a programu **E1%**, kde je koncentrace proteinu počítána přístrojem podle stejné rovnice, pouze hodnoty extinčních koeficientů jsou rozdílné. Pro program **BSA** je hodnota

tohoto koeficientu přednastavena na 6,7 a pro program **EI%** byla zjištěna experimentálně (6,16) a posléze vložena do programu. Při porovnání těchto dvou programů je z obrázku 3.7 patrné, že lepších výsledků je dosahováno při použití experimentálně zjištěného koeficientu. Lepších výsledků také dosahují hodnoty získané programem **EI%** v porovnání s programem **Mass extinction**, kde byla hodnota koeficientu také zjištěna experimentálně.

Na přístroji je také možnost zapnutí korekce, funkce *Background*. Jde o to, že přístroj automaticky proměří absorbanci při vlnové délce 320 nm a touto získanou hodnotou koriguje hodnoty absorbancí při 260 nm a 280 nm při výpočtu výsledné koncentrace. Při porovnání hodnot koncentrací získaných u všech pěti programů s použitím korekce a porovnáním s hodnotami koncentrací vypočtených, aniž by byly hodnoty naměřených absorbancí korigovány, nebyly nalezeny žádné výrazné odlišnosti v mediánových hodnotách koncentrací. U roztoků s vyšší koncentrací proteinu (od 6 mg/ml) bylo možno pozorovat nárůst hodnot koncentrací získaných výpočtem bez korekce hodnot absorbancí, ale tento nárůst hodnot koncentrací nebyl nijak výrazný. Například u teoretické koncentrace 15 mg/ml se zjištěná koncentrace s/bez zapnutí korekce lišila o hodnotu 0,37 mg/ml. Dále se také zvýšily hodnoty výběrových směrodatných odchylek. Přehled hodnot naměřených a přepočtených koncentrací (bez korekce pozadí) pro vybrané koncentrace je uveden v tabulce 3.5.

Tab 3.5 Porovnání naměřených a přepočtených hodnot koncentrací

Byla vybrána data získaná při měření v programu BSA, c značí koncentraci naměřenou tímto programem při zapnutí korekce. C_{BK} značí koncentraci vypočtenou bez korekce pozadí, c_T značí teoretickou koncentraci roztoku BSA. VSD označuje výběrovou směrodatnou odchylku.

c_T v mg/ml	c v mg/ml	VSD v mg/ml	c_{BK} v mg/ml	VSD v mg/ml
3	2,67	0,01	2,69	0,05
6	5,10	0,12	5,94	0,52
9	7,84	0,01	8,15	0,32
15	12,60	0,06	12,97	0,18

3.3.3 Zjištění obsahu vody v lyofilizovaném vzorku proteinu

Proteiny mají na sobě navázané větší či menší množství vody. Koncentrace roztoků připravených navážením a jejich rozpuštěním by se nemusela rovnat jejich skutečné koncentraci, protože v navázce proteinu už je obsaženo určité množství vody. Brodersen a kolektiv [53] ve své práci uvádí, že je voda vázána na hlavní polypeptidový řetězec proteinu.

Jak se změní hmotnost navážených proteinů po jejich sušení (kolik obsahují vody) je uvedeno v tabulce 3.6. Jsou zde v procentech uvedeny průměrné hodnoty úbytku hmotnosti pro dané proteiny.

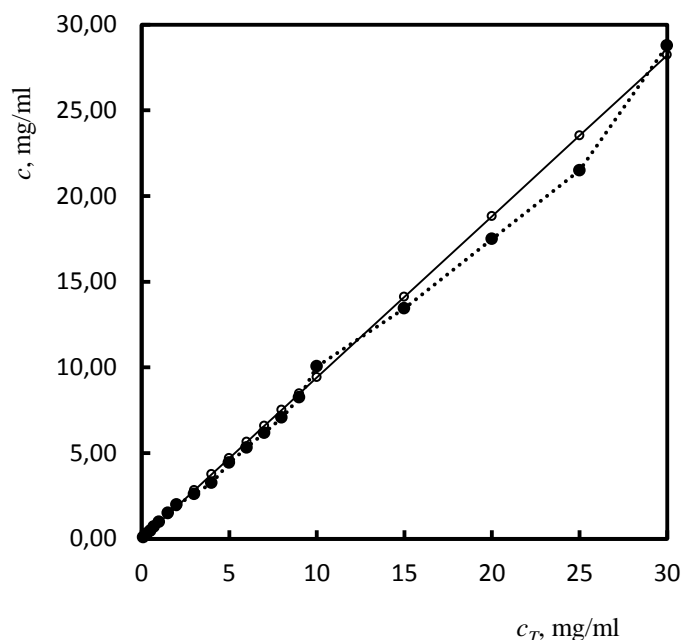
Tab 3.6 Úbytek hmotnosti proteinů

Protein	Úbytek hmotnosti v %	Výběrová směrodatná odchylka
BSA	5,94	0,13
HSA	8,58	0,12
Lysozym	3,38	0,69
α-laktalbumin	5,42	0,40
Vaječný albumin	7,07	0,23

Podíl vody se pohybuje od 3,4 do 8,6 %. Tyto hodnoty se shodují s hodnotami uváděnými Wangem [54], tedy, že podíl vody v lyofilizovaném vzorku proteinu je do 10 %.

Po výpočtu, kolik procent vody obsahovala navážka proteinu, byla pro roztoky BSA o různých koncentracích (0,1 – 30 mg/ml) vypočtena koncentrace těchto roztoků. Na obrázku 3.8 je pak znázorněna tato vypočtená koncentrace roztoků BSA spolu s koncentrací naměřenou za použití programu *E 1%*. Hodnoty koncentrací (naměřených a vypočtených) jsou prakticky totožné až do hodnot teoretické koncentrace 10 mg/ml. Odlišnost hodnot u roztoků BSA o vyšších koncentracích může být způsobena nepřesným pipetováním. Koncentrace naměřená při použití programu *E 1%* se od takto

přepočtených koncentrací roztoků proteinů liší mnohem méně. Z toho plyne, že je vhodné před měřením vzorky proteinů sušit.



Obr 3.8 Výsledky získané při použití programu E 1%

○ vypočtená koncentrace BSA; • označuje koncentraci BSA získanou při použití programu E 1%. Teoretická koncentrace (c_T) BSA v 0,1 mol/l fosfátovém pufru o pH 7,5 je 0,1; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25 a 30 mg/ml.

3.3.4 Vliv složení proteinu při měření koncentrace programem E1%

Při měření roztoků BSA o různých koncentracích za použití různých přednastavených programů na spektrofotometru NanoVue™ Plus, byl vybrán program **E 1%** a program **Protein UV** pro měření s dalšími proteiny (HSA, vaječný albumin, α -laktalbumin a lysozym). Tyto proteiny obsahují odlišný počet tryptofanových zbytků ve své molekule. Měření bylo provedeno s koncentracemi proteinů 1 mg/ml, 3mg/ml a koncentrace 5 mg/ml.

Tab 3.7 Porovnání naměřených a vypočtených hodnot koncentrací proteinů

c značí naměřené koncentrace proteinů získané při použití programu E 1% a VSD označuje výběrovou směrodatnou odchylku těchto naměřených hodnot; c_v označuje vypočtenou hodnotu koncentrace, která byla získána odečtením hmotnosti vody obsažené v navážce proteinu; c_T označuje teoretické koncentrace.

Protein	c_T v mg/ml	c_v v mg/ml	c v mg/ml	VSD v mg/ml
BSA	5	4,70	4,43	0,04
BSA	3	2,82	2,60	0,02
BSA	1	0,94	0,97	0,01
HSA	5	4,57	4,66	0,04
HSA	3	2,74	2,80	0,08
HSA	1	0,91	0,97	0,02
Lysozym	5	4,83	4,94	0,04
Lysozym	3	2,90	2,81	0,03
Lysozym	1	0,97	0,94	0,01
Vaj. albumin	5	4,65	4,47	0,07
Vaj. albumin	3	2,79	2,67	0,02
Vaj. albumin	1	0,93	0,91	0,01
α -laktalbumin	5	4,73	4,73	0,02
α -laktalbumin	3	2,84	3,00	0,05
α -laktalbumin	1	0,95	0,97	0,01

Z tabulky 3.7 vyplývá, že hodnoty naměřených i vypočtených koncentrací pro teoretickou koncentraci 1 mg/ml jsou podobné u všech pěti použitých proteinů.

U teoretických koncentrací 3 mg/ml a 5 mg/ml je vidět nepatrný rozdíl mezi naměřenou a vypočtenou koncentrací proteinu. Tyto rozdíly nepřesahují hodnoty intervalů spolehlivosti vypočtených pro jednotlivé koncentrace a proteiny. Odlišné hodnoty koncentrací jsou srovnatelné s chybou vlastního spektrofotometrického měření.

Ze zjištěných výsledků je patrné, že při měření koncentrace proteinů v programu **E 1%** nemá odlišné aminokyselinové složení proteinu vliv na toto stanovení koncentrace. Odlišnost aminokyselinového složení proteinu by toto stanovení koncentrace ovlivnila, pokud by nebyly pro jednotlivé proteiny zjištěny, experimentálně nebo z literatury, příslušné hodnoty extinkčních koeficientů, které jsou pro různé proteiny odlišné (viz tabulka 3.3). V případě, že by pro všechny proteiny byla použita stejná hodnota extinkčního koeficientu, mělo by aminokyselinové složení proteinu vliv na správnost stanovení koncentrace pomocí programu **E1%**.

3.3.5 Vliv složení proteinu při měření koncentrace programem **Protein UV**

Jak je vidět v tabulce 3.8, pokud je použit pro zjištění koncentrace proteinu ve vzorku program **Protein UV**, dostaneme hodnoty koncentrací, které jsou odlišné od vypočtené hodnoty koncentrace proteinů. U roztoků proteinů, které obsahují malé množství aromatických kyselin (především tryptofanu), tedy roztoků BSA, HSA a vaječného albuminu byly naměřené hodnoty koncentrací zdánlivě nižší. Tento pokles hodnot koncentrací bylo možno pozorovat u všech koncentrací (1 – 5 mg/ml). V případě vzorků obsahujících BSA můžeme pozorovat rozdíl mezi vypočtenou a naměřenou koncentrací proteinu okolo 35%. U roztoků obsahujících HSA je rozdíl těchto hodnot průměrně o 40 % a u roztoků s vaječným albuminem pozorujeme rozdíl okolo 27%. Největší rozdíl byl tedy pozorován u roztoků proteinu s nejnižším počtem tryptofanových zbytků ve své molekule (HSA). Naopak nejnižší rozdíl mezi hodnotami koncentrací vidíme u vaječného albuminu, který má z těchto uvedených proteinů (HSA, BSA a vaječný albumin) nejvíce tryptofanových zbytků ve své molekule.

Pokud jde o proteiny s vysokým obsahem tryptofanových zbytků (lysozym a α -laktalbumin) jejich naměřené koncentrace převyšovaly hodnoty vypočtených koncentrací. I zde bylo možné pozorovat závislost mezi obsahem tryptofanových zbytků a velikostí chyby. U roztoků obsahujících lysozym, který má nejvíce tryptofanových zbytků, byly naměřené koncentrace průměrně 2,5 krát vyšší než vypočtená koncentrace. Roztoky obsahující α -laktalbumin měly naměřenou koncentraci dvakrát vyšší, než byla

hodnota vypočtené koncentrace.

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že při stanovení koncentrace proteinů programem **Protein UV**, má aminokyselinové složení (zastoupení aromatických aminokyselin) velký vliv na správnost zjištěné hodnoty koncentrace.

Tab 3.8 Vypočtené a naměřené hodnoty koncentrací proteinů při použití programu Protein UV

c_v označuje vypočtenou koncentraci proteinu, která byla získána odečtením hmotnosti vody obsažené v navážce proteinu, c značí koncentraci získanou při použití programu Protein UV a VSD je výběrová směrodatná odchylka pro tyto naměřené hodnoty, c_T značí teoretickou koncentraci

Protein	c_T v mg/ml	c_v v mg/ml	c v mg/ml	VSD v mg/ml
BSA	5	4,70	2,96	0,02
BSA	3	2,82	1,84	0,03
BSA	1	0,94	0,60	0,02
HSA	5	4,57	2,95	0,03
HSA	3	2,74	1,67	0,05
HSA	1	0,91	0,49	0,01
Lysozym	5	4,83	13,11	0,05
Lysozym	3	2,90	7,31	0,07
Lysozym	1	0,97	2,30	0,02
Vaj. albumin	5	4,65	3,50	0,10
Vaj. albumin	3	2,79	2,02	0,00
Vaj. albumin	1	0,93	0,65	0,02
α -laktalbumin	5	4,73	9,80	0,11
α -laktalbumin	3	2,84	5,83	0,03
α -laktalbumin	1	0,95	1,91	0,03

3.4 Ověření výpočty

3.4.1 Srovnání vypočtených hodnot molárního absorpčního koeficientu

Hodnotu molárního absorpčního koeficientu můžeme získat výpočtem z rovnice 2 (str. 16) nebo pomocí webových kalkulátorů. Hodnota molárního absorpčního koeficientu proteinu BSA vypočtená podle rovnice 2 je 45 175 mol/g.cm. V případě použití webového kalkulátoru [22] je hodnota tohoto koeficientu 41 180 mol/g.cm. Výsledky se liší, protože pro výpočet byly použity rovnice s odlišnými číselnými koeficienty. Obě rovnice jsou uvedeny níže.

$$\epsilon_{280}=(X_{\text{Trp}})5500+(X_{\text{Tyr}})1490+(X_{\text{Cys}})125 \quad (2)$$

$$\epsilon_{280}=(X_{\text{Trp}})5690+(X_{\text{Tyr}})1280+(X_{\text{Cys}})120 \quad (9)$$

V obou případech X označuje počet příslušných aminokyselinových zbytků v molekule proteinu. Při použití jiného webového kalkulátoru [21] byla hodnota molárního absorpčního koeficientu sekretovaného proteinu 42 988 mol/g.cm a hodnota pro cytosolární protein byla 40 800 mol/g.cm. U tohoto webového kalkulátoru není uvedeno, podle jakých rovnic jsou hodnoty koeficientů vypočteny. Dosazením počtu příslušných aminokyselinových zbytků do rovnic 2 a 9 bylo prokázáno, že ani jedna z těchto rovnic nebyla tímto kalkulátorem použita. Třetí uváděný kalkulátor nemohl být využit, protože v současné době již není dostupný.

3.4.2 Význam číselných koeficientů pro stanovení proteinů dle „Christiana-Warburga“

Programy *Protein UV* a *Christian-Warburg* používají pro výpočet koncentrace proteinu rovnici 6 (str. 24). Jak již bylo řečeno, tato rovnice je navržena podle dat získaných z práce Christiana a Warburga. Na základě stejných dat byla navržena také rovnice 3 (str. 17), s rozdílnými hodnotami číselných koeficientů (1,45 a 0,74). Z hodnot absorbancí naměřených v této práci (A_{280} a A_{260}) pro různé koncentrace proteinu BSA byly vypočteny pomocí obou rovnic koncentrace proteinu. Takto získané

hodnoty byly navzájem porovnány mezi sebou a s navážkami (viz tab. 3. 9).

Tab 3.9 Vypočtené hodnoty koncentrací proteinu BSA za použití různých rovnic c_T označuje teoretickou koncentraci proteinu vypočtenou z navážky, c_1 označuje koncentraci proteinu vypočtenou podle rovnice $c = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$ a c_2 označuje koncentraci proteinu vypočtenou podle rovnice $c = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}$, VSD označuje výběrovou směrodatnou odchylku daných hodnot

c_T v mg/ml	c_1 v mg/ml	VSD v mg/ml	c_2 v mg/ml	VSD v mg/ml
1	0,60	0,03	0,54	0,03
2	1,30	0,04	1,19	0,03
5	3,18	0,05	2,91	0,04
10	6,04	0,04	5,55	0,04
15	8,87	0,05	8,15	0,05
20	11,47	0,07	10,79	0,06
30	17,90	0,10	16,43	0,09

Jak je z dat v tabulce 3.9 patrné, všechny hodnoty koncentrací proteinů získané výpočtem z rovnice používané programem *Protein UV* a programem *Christian-Warburg* mají zdánlivě vyšší hodnotu ve srovnání s hodnotami získanými pomocí rovnice 3. Hodnoty výběrových směrodatných odchylek jsou při daných koncentracích proteinu stejné, nebo pro hodnoty c_1 jsou vyšší.

3.4.3 Vliv složení proteinů na hodnotu „celkové koncentrace“

Rovnice 6 (str. 24) se spíše než k výpočtu koncentrace roztoku čistého proteinu používá k výpočtu koncentrace směsi proteinů nebo vzorku obsahujícího protein v přítomnosti nukleových kyselin. Pro testování její použitelnosti byly teoreticky (výpočtem) modelovány směsi proteinů složených z BSA, HSA, α -laktalbuminu, vaječného albuminu a lysozymu v různých poměrech. Při výpočtu koncentrací těchto směsí byly použity v této práci změřené hodnoty absorbancí čistých roztoků jednotlivých proteinů o koncentraci 1 mg/ml. V následující tabulce je uveden přehled

směsných vzorků, které obsahují dané proteiny v určitých poměrech, a příslušné vypočtené hodnoty koncentrace.

Tab 3.10 Tabulka koncentrací teoretických směsí proteinů

c označuje koncentraci získanou výpočtem podle rovnice $c = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$. Hodnoty směsí A_{280} a A_{260} byly vypočteny z hodnot absorbancí čistých roztoků příslušných proteinů o koncentraci 1 mg/ml.

Směs	poměrné zastoupení proteinů					c v mg/ml
	BSA	HSA	α - laktalbumin	lysozym	vaječný albumin	
1.	2	2	2	2	2	1,08
2.	9	0,25	0,25	0,25	0,25	0,69
3.	3	-	3	3	1	1,50
4.	4	-	2	2	2	1,13

Z výše uvedených hodnot je patrné, že vypočtená koncentrace směsi č.1, kde byly proteiny zastoupeny ve stejném poměru, je nejbližší předpokládané koncentraci 1 mg/ml. Naopak tomu je u směsi č. 2, ve které je dominantní jedna složka (BSA). Z výsledků vyplývá, že pokud směs proteinů obsahuje více proteinu s nižším počtem tryptofanových zbytků v molekule, bude i vypočtená hodnota koncentrace nižší než jakou předpokládáme. V případě, že ve směsi budou více zastoupeny proteiny s vyšším obsahem tryptofanových zbytků, bude i získaná koncentrace nabývat vyšších hodnot. Docházíme tedy k závěru, že aminokyselinové složení proteinu, především obsah tryptofanu, má vliv na hodnoty naměřených absorbancí a tedy i na hodnoty vypočtených koncentrací.

Pokud pro výpočet koncentrací výše popsaných teoretických směsí proteinů použijeme rovnici 7 (str. 24), podle které vypočítává koncentraci přednastavený program **E 1%** v přístroji NanoVueTM Plus, získáme hodnoty uvedené v tabulce 3.11.

Tab 3.11 Tabulka s vypočtenou koncentrací teoretických směsí proteinů

c označuje koncentraci získanou výpočtem podle rovnice $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (A_{280} \cdot 10000) / E_{1\%}$. Hodnoty směsí A_{280} a $E \text{ 1\%}$ byly vypočteny z hodnot absorbancí čistých roztoků příslušných proteinů o koncentraci 1 mg/ml a hodnot $E \text{ 1\%}$ pro čisté roztoky těchto proteinů.

směs	poměrné zastoupení proteinů					c v mg/ml
	BSA	HSA	α - laktalbumin	lysozym	vaječný albumin	
1.	2	2	2	2	2	0,78
2.	9	0,25	0,25	0,25	0,25	0,99
3.	3	-	3	3	1	0,80
4.	4	-	2	2	2	0,82

Hodnoty v tabulce 3.11 ukazují, že nejbližší se předpokládané koncentraci 1 mg/ml přiblížíme, pokud v teoretické směsi dominuje protein BSA. V ostatních případech získáváme hodnoty koncentrací nižší, než je koncentrace předpokládaná. Při porovnání hodnot uvedených v tabulce 3.10 a 3.11 vidíme, že použití programu **Protein UV** nebo **Christian-Warburg** je vhodné spíše pro měření koncentrace proteinů ve směsi s dalšími proteiny, kde je zastoupení jednotlivých proteinů přibližně stejné. Nebo, jak již bylo řečeno, ve směsi s nukleovými kyselinami. Naopak program **E 1%** je vhodné použít pro zjištění koncentrace roztoků obsahujících čisté proteiny a pro směsi, ve kterých převažuje jeden protein.

4 Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že vhodný objem nanášeného vzorku pro roztoky proteinů, které byly v této práci použity, je 4,5 μ l.

Při porovnání hodnot absorbancí získaných na spektrofotometru NanoVueTM Plus a spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E byly získány stejné hodnoty absorbancí při vlnové délce 280 nm.

Dále bylo zjištěno, že při měření na spektrofotometru NanoVueTM Plus dochází k odpařování vzorku, což má za následek naměření vyšších hodnot absorbancí.

Experimentálně byly získány hodnoty extinkčních koeficientů pro různé proteiny, jejichž koncentrace byla měřena přednastavenými programy na přístroji NanoVueTM Plus. Tímto experimentem se prokázalo, že správných a přesných hodnot je dosahováno při použití programu E 1%. Měřením bylo prokázáno, že správnost hodnot získaných programem E 1% není ovlivněna aminokyselinovým složením proteinů na rozdíl od hodnot získaných programem Protein UV.

5 Seznam citované literatury

- 1 Novák, F.: *Úvod do klinické biochemie*. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2002
- 2 Peters, T.: *All About Albumin, Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. San Diego, Academic Press, 1996
- 3 Krajhanzl, A.; Hladík, J. a kolektiv: *Biochemické metody, Návodů k pokročilým praktickým cvičením*. Praha, Nakladatelství Karolinum, 1991
- 4 Šperligová, I.; Dobrowská, L.; Tichý, M.; Kučera, J.: Příprava referenčního materiálu „Celkové bílkoviny v lidské moči“. *Pracovní lékařství* **49**, 143-149 (1997)
- 5 Peters, T.: Serum Albumin: Recent Progress in the Understanding of Its Structure and Biosynthesis. *Clinical Chemistry* **23**, 5-12 (1977)
- 6 Gill, S. C.; Hippel, P. H.: Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry* **182**, 319-326 (1989)
- 7 Canfield, R. E.: The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry* **238**, 2698-2707 (1963)
- 8 Prager, E. M.; Arnheim, N.; Mross, G. A.; Wilson, A. C.: Amino Acid Sequence Studies on Bobwhite Quail Egg White Lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry* **247**, 2905-2916 (1972)
- 9 Brew, K.; Vanaman, T. C.; Hill, R. L.: Comparison of the Amino Acid Sequence of Bovine α -Lactalbumin and Hens Egg White Lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry* **242**, 3747-3748 (1967)
- 10 Nisbet, A. D.; Saundry, R. H.; Moir, A. J. G.; Fothergill, L. A.; Fothergill, J.: The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. *The European Journal of Biochemistry* **115**, 335-345 (1981)
- 11 Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T.: How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein. *Protein Science* **4**, 2411-2423 (1995)
- 12 Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2007
- 13 Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2004

- 14 Branwell, C. N.; McCash, E. M.: *Fundamentals of Molecular Spectroscopy, Fourth Edition*. London, McGraw-Hill Publishing Company, 1994
- 15 Owen, T.: *Fundamentals of UV-visible Spectroscopy*. Germany, Hewlett-Packard, Publication number 12-5965-5123E, 1996
- 16 Zimmermannová, J.: Stanovení proteinů- porovnání různých metod. *Bakalářská práce*, KATA, Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2012
- 17 Simonian, M. H.: Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Cell Biology* (2002), A.3B.1-A.3B.7, Copyright © 2002 by John Wiley & Sons, Inc., dostupné z <http://webdoc.nyumc.org/nyumc/files/sun-lab/attachments/CPCB.App3.Techniques.pdf> (staženo 4.4.2013)
- 18 Káš, J.: *Laboratorní cvičení z biochemie*. Nakladatelství UP Olomouc, 2000
- 19 Aitken, A.; Learmonth, M.: Protein Determination by UV Absorption. Z knihy *The Protein Protocols Handbook* (Walker, J.M., ed.) Totowa, NJ, Humana Press, 1996
- 20 Kreusch, S.; Schwedler, S.; Tautkus, B.; Cumme, G. A.; Horn, A.: UV Measurements in Microplates Suitable for High-Throughput Protein Determination. *Analytical Biochemistry* **313**, 208-215 (2003)
- 21 Protein Extinction Coefficient Calculator, BioMolNet, dostupné z <http://www.biomol.net/en/tools/proteinextinction.htm> (4.4.2013)
- 22 Peptide Property Calculator (Northwestern University, USA), dostupné z <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html> (4.4.2013)
- 23 Protein Calculator v 3.3, dostupné z <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html> (4.4.2013)
- 24 Colowick, S. P.; Kaplan, N. O.: *Methods in Enzymology III*. New York, Academic Press, 1957
- 25 Hewlett-Packard Product Note, *Determination of Total Protein Using Classical Single and Two-wavelength Methods*. Publication number 12-5091- 3620E (1992)
- 26 Warburg, O.; Christian, W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift* **310**, 384-421 (1941)
- 27 Goldfarb, A. R.; Saidel, L. J.; Mosovich, E.: The Ultraviolet Absorption Spectra

- of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 397-404 (1951)
- 28 Scopes, R. K.: Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 nm. *Analytical Biochemistry* **59**, 277-282 (1974)
- 29 Gornall, A. G.; Bardawill, Ch. J.; David, M. M.: Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *The Journal of Biological Chemistry* **177**, 751-766 (1949)
- 30 Robinson, H. W.; Hogden, C. G.: The Biuret Reaction in The Determination of Serum Proteins: I. A Study of The Conditions Necessary for The Production of a Stable Color Which Bears a Quantitative Relationship to The Protein Concentration. *The Journal of Biological Chemistry* **135**, 707-725 (1940)
- 31 Lucarini, A. C.; Kilikian, B. V.: Comparative Study of Lowry and Bradford Methods: Interfering Substances. *Biotechnology Techniques* **13**, 149-154 (1999)
- 32 Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.: Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275 (1951)
- 33 Olson, B. J. S. C.; Markwell, J.: Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science*. Unit 3.4.1- 3.4.29 (2007), Copyright © 2007 by John Wiley & Sons, Inc., dostupné z <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/0471111848/0471111848-sampleUnit.pdf> (staženo 6.1. 2013).
- 34 Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.: Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85 (1985)
- 35 Schoel, B.; Welzel, M.; Kaufmann, S. H. E.: Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **30**, 199-206 (1995)
- 36 Sedmak, J. J.; Grossberg, S. E.: A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G 250. *Analytical Biochemistry* **79**, 544-552 (1977)

- 37 Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**,248-254 (1976)
- 38 Kruger, N. J.: The Bradford Method for Protein Quantitation. Z knihy *The Protein Protocols Handbook*. (Walker, J. M., ed.) Totowa, NJ, Humana Press, 2002 - dostupné z <http://www.springerlink.com/content/q511647130312713/fulltext.pdf> (staženo 26. 4. 2010)
- 39 Compton, S. J.; Jones, C. G.: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* **151**, 359-374 (1985)
- 40 Klotz, I. M.: The Effects of Salts and Proteins on the Spectra of Some Dyes and Indicators. *Chemical Reviews* **42**, 373-399 (1947)
- 41 Lepper, E. H.; Martin, Ch. J.: The Protein Error in estimating pH with Neutral Red and Phenol Red. *Biochemical Journal* **21**,356-361 (1927)
- 42 Free, A. H.; Chauncey, O. R.; Metzler, I.: Studies with a New Colorimetric Test for Proteinuria. *Clinical Chemistry* **3**:6, 716-727 (1957)
- 43 Wei, Y.; Li, K.; Tong, S.: The interaction of Bromophenol Blue with proteins in acidic solution. *Talanta* **43**, 1-10 (1996)
- 44 Flores, R.: A rapid and reproducible assay for quantitative estimation of proteins using bromophenol blue. *Analytical Biochemistry* **88**, 605-611 (1978)
- 45 Doumas, B. T.; Watson, W. A.; Biggs, H. G.: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica acta* **31**, 87-96 (1971)
- 46 Jenway New Genova Nano, dostupné z http://www.jenway.com/adminimages/Genova_NANO_leaflet_4pp%281%29.pdf (staženo 7.4.2013)
- 47 Colibri Microvolume Spectrometer, dostupné z http://www.titertek-berthold.com/data/Colibri_downloadID74288.pdf (staženo 6.4.2013)
- 48 Riepl, M.; Graehl, H; Funk, H.; Gawanbacht, A.; Klopocki, E.; Kartha, R.: The NonoPhotometer[®] Pearl Comparison of the Perfotmance Characteristics of the New NonoPhotometer[®] Pearl and the NanoDrop 2000c. *Publication NonoPhotometer[®] Pearl Application Notes*, dostupné z <http://www.implen.de/publications/comparison-nanodrop-vs-nanophotometer>

- (staženo 21.4.2013)
- 49 NanoVue™ Plus Spectrophotometer, GE Healthcare Data file 28-9301-69 AC, dostupné z https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc28930169AC_20110831220033.pdf (staženo 6.4.2013)
- 50 NanoVue™ Plus, GE Healthcare Product User Manual 25-9574-75UM AE (2010), dostupné z https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc28957475AE_20110831204331.pdf (staženo 11.8.2012)
- 51 Compatible Buffers, Detergents, and Solvents for Samples on NanoVue™ Plus Spectrophotometer, GE Healthcare Instruction/Protocol 28-9769-70 AA, dostupné z https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc28976970AA_20110831202706.pdf (staženo 6.4.2013)
- 52 *Current Protocols in Protein Science*. Supplement 2, 3.4.11-3.4.12 (1995), dostupné z http://www.ibt.lt/uploads/file/bvtl-2/assays_3.pdf (staženo 4.4.2013)
- 53 Brodersen, R.; Haugaard, B. J.; Jacobsen, C.; Pedersen, A. O.: Main-chain Sorption of Water by Serum Albumin. *Acta Chemica Scandinavica* **27**, 573-582 (1973)
- 54 Wang, W.: Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* **203**, 1-60 (2000)